

Aufnahme und Metabolisierung
kurzkettiger Sulfonsäuren
in der Grünalge *Chlorella fusca*

Susanne Biedlingmaier

Aufnahme und Metabolisierung kurzkettiger Sulfonsäuren
in der Grünalge Chlorella fusca

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereiches Biologie
an der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Susanne Biedlingmaier
aus
Bietigheim

1986

1. Berichterstatter: Prof.Dr.A.Schmidt

2. Berichterstatter: Prof.Dr.W.Rau

Tag der mündlichen Prüfung: 4.November 1986

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. <u>Einleitung</u>	1
B. <u>Material und Methoden</u>	7
2.1 <u>Biologisches Material</u>	7
2.1.1 Anzuchtbedingungen	7
2.1.2 Ernte der Organismen	9
2.1.3 Zellzahlbestimmung	10
2.1.4 Rohextraktgewinnung	10
2.2 <u>Chemikalien</u>	11
2.2.1 Unmarkierte Sulfonsäuren	11
2.2.2 Markierte Sulfonsäuren	12
2.2.2.1 Synthese der ³⁵ S-markierten Äthansulfonsäure	12
2.2.2.2 Aufreinigung der ³⁵ S-markierten Äthansulfonsäure	14
2.2.2.3 Aufreinigung von ³⁵ S-Taurin	15
2.2.3 Sonstige Chemikalien	15
2.3 <u>Geräte</u>	15
2.4 <u>Chemische Nachweisverfahren</u>	17
2.4.1 Chlorophyllbestimmung	17
2.4.2 Proteinbestimmung	18
2.4.3 Nachweisreagenzien	18
2.4.3.1 Sulfonsäurenachweis	18
2.4.3.2 Aminosäurenachweis	19
2.4.3.3 Lipidnachweis	19
2.4.4 Sulfitbestimmung	19
2.4.5 Sulfatbestimmung	20
2.4.6 Sulfidbestimmung	20
2.4.7 Cysteinbestimmung	20
2.4.8 Bestimmung von Carbonylgruppen	20
2.4.9 Phosphatbestimmung	21
2.4.10 Bestimmung des Fettgehaltes	21
2.4.11 Bestimmung des Stärkegehaltes	22

	Seite
2.5 <u>Trennverfahren</u>	22
2.5.1 Dünnschichtchromatographie (DC)	22
2.5.2 Dünnschichtelektrophorese (DE)	23
2.5.3 Gaschromatographie	24
2.5.4 Aminosäureanalyse	24
2.6 <u>Enzymteste</u>	25
2.6.1 Desulfonase	25
2.6.2 α -Hydroxylase	25
2.6.3 Thiosulfatreduktase (E.C. 2.2.8.1)	25
2.6.4 Cysteinsynthase (E.C. 4.2.99.8)	26
2.6.5 Cysteindesulphydrase (E.C. 4.4.1.1)	26
2.6.5.1 L-Cysteindesulphydrase	26
2.6.5.2 D-Cysteindesulphydrase	27
2.6.6 Arylsulfatase (E.C. 3.1.6.1)	27
2.6.7 Sulfataktivierung	27
2.6.8 Glutaminsynthetase (E.C. 6.3.1.2)	28
2.6.9 Nitratreduktase (E.C. 1.6.6.2)	28
2.7 <u>Aufnahmeteste</u>	29
2.7.1 Versuchsbedingungen bei Grün- und Blaualgen	29
2.7.2 Versuchsbedingungen bei Lemna minor	29
2.7.3 Bestimmung der aufgenommenen Radioaktivität	30
2.8 <u>Fraktionierter Zellaufschluß</u>	30
2.8.1 Allgemeiner Verlaufsplan	30
2.8.2 Nachweis flüchtiger Verbindungen mit Hilfe der Conway-Technik ..	31
C. <u>Ergebnisse</u>	32
3. <u>Wachstum photosynthetischer Organismen auf Sulfonsäuren als</u> <u>einzigster Schwefelquelle</u>	32
3.1 Verwertung ausgewählter Sulfonsäuren als Schwefelquelle durch die Grünalge Chlorella fusca 211-8b	32
3.1.1 Wachstum auf verschiedenen Alkyl- und Arylsulfonsäuren	32
3.1.2 Vergleich des Wachstums auf Äthansulfonsäure und Sulfat	35
3.2 Wachstum photosynthetischer Organismen auf Äthansulfonsäure und Taurin als einziger Schwefelquelle	37
3.3 Zusammenfassung	40

	Seite
4. <u>Sulfonsäure-Aufnahme in photosynthetische Organismen</u>	41
4.1 Sulfonsäure-Aufnahme versus Sulfonatverwertung	41
4.1.1 Äthansulfonsäure-Aufnahme in photosynthetische Organismen	41
4.1.2 Taurinaufnahme in photosynthetische Organismen	43
4.2 Sulfonsäure-Aufnahme versus Ernährungsbedingungen	45
4.2.1 ÄSS-Aufnahme bei unterschiedlichem Ernährungsstatus	46
4.2.2 Taurinaufnahme bei unterschiedlicher Schwefelversorgung	47
4.3 Ausbildung der Sulfonsäure-Aufnahme in <i>Chlorella fusca</i> in Abwesenheit von Sulfat	48
4.3.1 Ausbildung des Äthansulfonat-Aufnahmesystem	48
4.3.2 Ausbildung des Taurin-Aufnahmesystems bei Sulfatmangel	50
4.4 Zurückbildung der Sulfonsäure-Aufnahme nach Sulfatzugabe	51
4.4.1 Rückbildung des Äthansulfonat-Aufnahmesystems	51
4.4.2 Rückbildung des Taurin-Aufnahmesystems nach Sulfatzugabe	52
4.5 Zusammenfassung	53
 5. <u>Charakterisierung der ÄSS-Aufnahme in <i>Chlorella fusca</i></u>	54
5.1 Linearität der ÄSS-und Sulfataufnahme	54
5.1.1 Zeitabhängigkeit der Aufnahme	54
5.1.2 Abhängigkeit der Aufnahmeraten von der Zellzahl	55
5.2 Äthansulfonat-Efflux	55
5.3 Substratabhängigkeit und Kinetik des ÄSS-Transportes	56
5.4 Temperaturabhängigkeit	56
5.5 pH-Abhängigkeit	58
5.6 Substratspezifität	60
5.6.1 Strukturanaloga der Äthansulfonsäure	60
5.6.2 Einfluß anderer Schwefelanionen und Schwefelverbindungen auf die ÄSS-Aufnahme in <i>Chlorella fusca</i>	62
5.7 Hell/Dunkel-Effekte	63
5.8 Inhibitoren der ÄSS-und Sulfataufnahme	64
5.8.1 Metabolische Inhibitoren	64
5.8.2 SH-Gruppen Inhibitoren und Schwermetallionen	65
5.9 Stimulatoren der ÄSS-und Sulfataufnahme	67
5.9.1 Kationeneffekte	67
5.9.2 Phosphateffekte	69
5.9.3 Aminosäureeffekte	71
5.10 Zusammenfassung	72
5.11 ANHANG: Die Sulfataufnahme in ÄSS-Kulturen	73

6.	<u>Charakterisierung der Taurinaufnahme in Chlorella fusca</u>	78
6.1	Taurinaufnahme unter Sulfat/Schwefel-Mangelbedingungen	78
6.1.1	Substratabhängigkeit und Kinetik des Taurintransportes	79
6.1.2	pH-Abhängigkeit	79
6.1.3	Substratspezifität	80
6.1.4	Inhibitoren der Taurinaufnahme	82
6.1.5	Stimulatoren der Taurinaufnahme	83
6.1.5.1	Phosphateffekt	83
6.1.5.2	Kationeneffekt	83
6.2	Taurinaufnahme unter Nitrat/Stickstoff-Mangelbedingungen	85
6.2.1	Ausbildung eines Taurinaufnahmesystems bei N-Mangel	85
6.2.1.1	Entwicklung der Taurinaufnahme nach Umsetzung auf N-Mangelmedium	85
6.2.1.2	Entwicklung der Taurinaufnahme in N/30-Kulturen	86
6.2.2	Charakterisierung der Taurinaufnahme bei N-Mangel	87
6.2.2.1	Substratabhängigkeit und Kinetik des Taurintransportes .	87
6.2.2.2	pH-Abhängigkeit der Taurinaufnahme	88
6.2.2.3	Substratspezifität	89
6.2.3	Wachstum auf Taurin als einziger N-Quelle	90
6.3	Zusammenfassung	91
6.4	ANHANG: Taurinaufnahme in ausgewählte photosynthetische Organismen	92
7.	<u>Beschreibung der ÄSS/Taurin-Metabolisierung in Chlorella fusca</u>	96
7.1	Abbau von ³⁵ S-markierter Äthansulfonsäure in Chlorella fusca ...	96
7.1.1	Identifikation der wasserlöslichen ³⁵ S-Verbindungen	97
7.1.2	Identifikation der chloroform-löslichen ³⁵ S-Verbindungen	98
7.1.3	Nachweis flüchtiger ³⁵ S-markierter Verbindungen	99
7.2	Abbau von ³⁵ S-markiertem Taurin in Chlorella fusca	100
7.2.1	Identifikation der wasserlöslichen ³⁵ S-Verbindungen	100
7.2.2	Identifikation der chloroform-löslichen ³⁵ S-Verbindungen	102
7.3	Abbau von ³ H-markiertem Taurin in Chlorella fusca	102
7.3.1	Identifikation der wasserlöslichen ³ H-Verbindungen	103
7.3.2	Identifikation der chloroform-löslichen ³ H-Verbindungen	103
7.3.3	Nachweis flüchtiger ³ H-markierter Verbindungen	104
7.4	Kurzzeitanalysen der Sulfonsäure-Metabolisierung	104
7.5	Abbau von ÄSS/Taurin in S-Mangelkulturen von Chlorella fusca ...	105

	Seite
7.6 Taurinabbau in N/30-Kulturen von <i>Chlorella fusca</i>	105
7.7 Metabolisierung von ³⁵ S-Sulfat in <i>Chlorella fusca</i> unter verschiedenen Ernährungsbedingungen	107
7.8 Sulfonsäureabbau im zellfreien System	109
7.9 Zusammenfassung	111
7.10 ANHANG: Die Metabolisierung von Äthansulfonsäure in <i>Anabaena</i> <i>variabilis</i>	112
8. <u>Regulation von Sulfonsäureaufnahme und anderer enzymatischer</u> <u>Prozeße bei wechselnden Ernährungsbedingungen</u>	113
8.1 Beeinflussung von ÄSS/Taurin/Sulfataufnahme in <i>Chlorella fusca</i> durch Cystein/Methioninzugabe ins Kulturmedium	113
8.2 Reaktionen auf zunehmenden S-Mangel im Kulturmedium	115
8.3 Reaktionen auf zunehmenden N-Mangel im Kulturmedium	117
8.4 Veränderung ausgewählter Enzymaktivitäten bei Wachstum auf Äthansulfonsäure	119
8.5 Zusammenfassung	120
8.6 ANHANG: Veränderung von Fettsäure-und Aminosäure-Zusammensetzung bei unterschiedlicher S/N-Ernährung	121
D. <u>Diskussion</u>	124
E. <u>Zusammenfassung</u>	175
F. <u>Literaturverzeichnis</u>	178

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Ac	=	Acetat
ADP	=	Adenosin-5'-diphosphat
AEP	=	Aminoäthylphosphat
AMP	=	Adenosin-5'-monophosphat
APS	=	Adenosin-5'-phosphosulfat
ÄSS	=	Äthansulfonsäure
ATP	=	Adenosin-5'-triphosphat
CCCP	=	Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon
CDP	=	Cytidin-5'-diphosphat
CTP	=	Cytidin-5'-triphosphat
Cys	=	Cystein
Cys-sre	=	Cysteinsäure
DC/DE	=	Dünnschichtchromatographie/Dünnschichtelektrophorese
DCCD	=	N,N'-dicyclohexylcarbodiimid
DCMU	=	(3-(3,4-dichlorphenyl))-1,1-dimethylurea
DGDG	=	Digalactosyldiglycerin
DIDS	=	4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbendisulfonat
DMBIB	=	2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-p-benzochinon (Dibromothymochinon)
2,4-DNP	=	2,4-Dinitrophenol
DTE	=	Dithioerythrit
E	=	Extinktion
FMN	=	Flavinmononucleotid
GSH	=	Glutathion
GTP	=	Guanosin-5'-triphosphat
H/D	=	Hell/Dunkel
Met	=	Methionin
MGDG	=	Monogalactosyldiglycerin
NADH/NADPH	=	Nicotinamidadenindinucleotid(phosphat)
NEM	=	N-Äthylmaleimid
NF	=	Neutralfette
OD ₆₈₀	=	Optische Dichte bei 680 nm
P _i	=	Phosphat
PC	=	Phosphatidylcholin
PCMBs	=	p-Chloromercuriphenylsulfonat
PE	=	Phosphatidyläthanolamin
PEP	=	Phosphoenolpyruvat

PG	=	Phosphatidylglycerin
PI	=	Phosphatidylinosit
PMSF	=	Phenylmethylsulfonylfluorid
ppGpp	=	Guanosin-3'-diphosphat-5'-diphosphat
PP _i	=	Pyrophosphat
SITS	=	4-acetamido-4'-isothiocyano-2,2'-stilbendisulfonat
SL	=	Sulfolipide
Std.	=	Stunde(n)
Tris	=	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
Vol.	=	Volumen
(v/v)	=	Volumenprozente
(w/v)	=	Gewichtsprozente

A. Einleitung

Sulfonsäuren, $R-SO_3H$, sind Derivate der Schwefelsäure H_2SO_4 , bei denen eine Hydroxylgruppe durch einen Kohlenstoffrest ersetzt ist ($R = \text{Alkyl- oder Aryl-}$). Sulfonsäuren sind daher starke Säuren und ihre Salze reagieren im Wasser praktisch neutral. Sie sind gut wasserlöslich und chemisch recht stabil.(35).

Sulfonsäuren besitzen eine große technische Bedeutung, da die nachträgliche Einführung der Sulfonsäuregruppe die Wasserlöslichkeit einer Verbindung erhöht und gleichzeitig das Grundmolekül weitgehend entgiftet, z.B. bei Pharmazeutika, Farbstoffen, Weichmachern oder optischen Aufhellern. Kunststoffe mit Sulfonsäuregruppen (etwa Polyvinylsulfonat) oder sulfonierte Copolymerisate finden zunehmend als Ionenaustauscherharze Verwendung. Zahlreiche aromatische Sulfonsäuren dienen als Ausgangs- oder Zwischenprodukt technischer Synthesen, und bei der Zellstoffgewinnung fallen Ligninsulfonsäuren in größeren Mengen an. Alkyl- und Alkylarylsulfonsäuren stellen die zur Zeit wohl wichtigsten Waschrohstoffe und Emulgiermittel dar (198).

Erwähnt werden soll auch die Bedeutung gewisser Sulfonsäurederivate in der Medizin. Viele Sulfonamide dienen als wichtige Chemotherapeutica, da sie als Strukturanaloga der p-Aminobenzoessäure die Folsäurebiosynthese und damit das Wachstum vieler Bakterien blockieren. Ein weiteres Sulfonamid ist der bekannte Süßstoff Saccharin.

All diese chemisch-technischen Sulfonsäureprodukte (von denen die synthetischen Waschmittel die mengenmäßig größte Gruppe darstellen (86)) werden jährlich im Millionen Tonnen Maßstab in die Umwelt abgegeben und dort abgebaut. Aus diesem Grund befaßte sich die Forschung bisher v.a. mit dem biologischen Abbau sulfonsäurehaltiger Detergentien durch Mikroorganismen (33/97/149/163/164/207/208).

Daneben gibt es auch bedeutende Sulfonsäurevorkommen natürlichen Ursprungs. So synthetisieren die Pflanzen 6-Sulfo-D-quinovose (Sulfolipid -Bestandteil) jährlich in Mengen von 3×10^{13} kg (79). Die Tiere wiederum bilden Taurin als Oxidationsprodukt des Cysteins in ähnlicher Größenordnung (94,188) und allein der Mensch scheidet jährlich 4×10^7 kg Taurin und abgeleitete Verbindungen aus (154). Taurin wird ferner konjugiert mit Cholsäuren (Taurocholsäure) in der Gallenflüssigkeit vieler Tiere aufgefunden. Auch Algen (124) und Bakterien enthalten Taurin, z.B. als Zellwandbestandteil von Staphylococcus aureus und Bacillus subtilis (100, 122, 140).

Mengenmäßig weniger bedeutend sind Sulfoessigsäure, Sulfomilchsäure, Sulfoacetaldehyd, Cysteinolsäure, Cysteinsäure und Homocysteinsäure, die in Algen und Bakterien nachgewiesen wurden (16, 118, 176, 205). In Navicula fand man neben Cysteinolsäure auch Sulfopropandiol (30) und aus methanogenen Bakterien wurde das neuartige Coenzym M (2-Mercaptoäthansulfonsäure) beschrieben (190).

In der Zellhülle bakterieller Capnocytophaga wurde 1980 ein noch unbekanntes Sulfonolipid entdeckt (70), das Capnin (2-Amino-3-hydroxy-15-methylhexadecan-1-sulfonsäure). Strukturell ist es mit 1-Deoxyceramid-1-sulfonsäure verwandt, das neben Sulfocholin und anderen Sulfolipiden als Membranbestandteil der Alge Nitschia alba auftritt (4).

Ferner kennt man natürlich vorkommende Alkansulfonsäuren, die abiotisch in der Atmosphäre als Oxidationsprodukte niedermolekularer Mercaptane und Sulfide gebildet werden (81) : Methansulfonsäure kann beispielsweise aus Methanthiol, Dimethylsulfid und Dimethyldisulfid mikrobiellen Ursprungs entstehen.

Um die Rückführung dieses mengenmäßig durchaus beachtlichen Sulfonatschwefels in den globalen Schwefelcyclus zu gewährleisten und ihn für andere Organismen verfügbar zu machen, muß ein Abbau der Sulfonsäuren in der Natur erfolgen. Entsprechende Abbauprozesse wurden bisher v.a. anhand heterotropher Organismen nachgewiesen, z.B. die Metabolisierung von Taurin und Cysteinsäure durch Pilze und Bakterien (107, 108, 109, 110, 177, 178, 179, 186). Auch der Katabolismus von Sulfolipiden wurde näher untersucht (80).

Über die Abbaufähigkeit der Algen, die ja zur Selbstreinigungskraft der Natur wesentlich beitragen können, ist dagegen in diesem Zusammenhang wenig bekannt. Es schien daher sinnvoll, die Rolle einiger Blau- und Grünalgen beim biologischen Abbau von Sulfonsäuren in natürlichen Gewässern näher zu überprüfen.

Als geeignetes Untersuchungsobjekt wurde die Grünalge Chlorella fusca ausgewählt und im Rahmen dieser Arbeit zur Klärung von **Aufnahme/Metabolisierung** natürlicher Sulfonsäuren eingesetzt.

Datillierte **Aufnahmestudien** einer aliphatischen Sulfonsäure gibt es bereits für den Transport der β -Aminosulfonsäure Taurin (2-Aminoäthansulfonsäure) in tierische und bakterielle Systeme: In beiden Fällen erwies sich die Taurinaufnahme als hochspezifischer Na-Cotransport (2, 12, 77, 101).

Überhaupt ist Taurin aufgrund seiner Bedeutung in der Humanmedizin die bisher am besten untersuchte Sulfonsäure. So zeigen z.B. Patienten deutlich erhöhte Taurinwerte bei Bluthochdruck, Epilepsie oder kurz nach einem Herzinfarkt (72). Bei Säugetieren dient Taurin als Neurotransmitter/Neuromodulator in zentralen Nervensystem und Retina (101). Es verhindert die mitochondriale Freisetzung von Calcium und setzt damit die Erregbarkeit von Muskelzellen herab (115). Daneben vermag Taurin auch die Ionenpermeabilitäten in tierischen Systemen zu verändern und spielt daher eine wichtige Rolle bei der Osmoregulation von marinen Invertebraten, Teleostiern, Amphibien oder dem menschlichen Herzen (191).

Abbaustudien über Taurin in tierischen Systemen liegen dagegen nicht vor, da sich Taurin als metabolisch außerordentlich stabil erwies und i.a. von Tieren nicht weiter abgebaut werden kann - im Gegensatz zu seinem Carboxylanalogon β -Alanin (β -Aminopropionsäure). So wird Taurin zumeist unverändert exkretiert (94, 188). Eine Ausnahmeerscheinung stellt seine Desaminierung zur Isäthionsäure dar (2-Hydroxy-äthansulfonsäure), die vereinzelt in Säugetierzellen beschrieben wurde. Generell scheint die Einführung einer Sulfonsäuregruppe in biologische Moleküle als eine Art Schutzmaßnahme gegenüber verfrühtem Abbau durch degradierende Enzyme zu dienen (Beibehaltung der Säurefunktion bleibt durch den Austausch Carboxyl/Sulfonsäuregruppe gewährleistet (8)).

In **Bakterien** wird das aufgenommene Taurin teilweise in die Zellwand eingebaut (181). Zumeist wird es jedoch abgebaut und unterstützt als C,S- und N-Quelle das bakterielle Wachstum (93, 107, 177, 186). - Untersuchungen zum genauen Reaktionsmechanismus des Taurinabbaus wurden zunächst von Kondo und Ishimoto durchgeführt (107, 108, 109, 110) und später von Shimamoto und Berk an einem definierten Bakterium (Pseudomonas aeruginosa) bestätigt (177, 178, 179) : Beidesmal scheint die β -Aminogruppe des Taurinmoleküls als primärer Angriffspunkt abbauender Enzyme zu dienen. Nach der Desaminierung wird der entstandene Sulfoacetaldehyd durch eine spezifische Sulfoacetaldehyd-Sulfolylase zu Sulfit und Acetat gespalten. Cofaktoren sind Thiaminpyrophosphat und Magnesium.

Auch **Pilze** wie z.B. Aspergillus niger können Taurin anstelle von Sulfat als Schwefelquelle nutzen (21): Taurin wird zunächst desaminiert, die entstehende Isäthionsäure (2-Hydroxyäthansulfonsäure) zu Sulfat gespalten.

Bei der Metabolisierung von **Cysteinsäure** durch aerobe Bakterien/Streptomyceten, die diese Verbindung als Quelle für S, C und N nutzen können, geht ebenfalls die Desaminierung der Desulfonierung voraus (186). Austrittsgruppe ist Sulfat. Einen Sonderfall stellen einige Sporenbildner dar, die das in der Mutterzelle gebildete Desaminierungsprodukt Sulfolactat direkt in die Sporen einbauen (16, 111).

Sulfolipide werden nach Hydrolyse des Diacylsulfoquinovosylglycerids zu Sulfoquinovose und über den "sulfolipolytischen Weg" weiter zu Sulfoacetaldehyd, Sulfolactat - Sulfoacetat gespalten (80, 120). Endprodukt ist wiederum Sulfat, wobei genauere Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus noch fehlen (120, 129).

Einige Untersuchungen befaßten sich auch mit der Metabolisierung **xenobiotischer** Sulfonsäuren. Dabei bestätigte sich, daß die Einführung einer Sulfonsäuregruppe ins Molekül die biologische Abbaubarkeit dieser Verbindung deutlich herabsetzte (121). Offensichtlich haben die natürlichen Destruenten größere Schwierigkeiten C-S Bindungen aufzubrechen als beispielsweise die C-C Bindung einer entsprechend gebundenen Carboxylgruppe (s.o.).

Theoretisch gesehen, müßten daher v.a. aromatische Sulfonsäuren (aufgrund der reversiblen Reaktionsweise einer aromatischen Sulfonierung (siehe 146)) einem biologischen Abbau über Hydrolyse wesentlich leichter unterliegen als die viel stabileren Alkylsulfonsäuren. In vivo schlagen jedoch Bakterien und Pilze bei der Metabolisierung von **Arylsulfonsäuren** neben dem hydrolytischen Abbauweg (207) noch andere Reaktionsmechanismen ein (58,208) :

- Bacillus spec. (207) ersetzt in Alkylbenzolsulfonsäuren die para-substituierte Sulfonsäuregruppe durch eine Hydroxylgruppe. Austrittsgruppe ist Sulfit, das anschließend entweder chemisch im Medium (33) oder durch eine nachgeschaltete Sulfitoxidase (163, 207) zu Sulfat aufoxidiert werden kann.
- Pseudomonas greift dagegen über eine Catechol-Dioxygenase und Bildung von Dihydroxyderivaten am Ring selbst an. Aus Benzolsulfonsäure entsteht so Pyrocatechol und Sulfit (58).
- Pilze metabolisieren Alkylbenzolsulfonsäuren unter direkter Freisetzung von Sulfat und reduktiver Spaltung der C-S Bindung (208).

Auch die thermodynamisch stabileren und reaktionsträgeren **Alkylsulfonsäuren** können in der Natur von Bakterien metabolisiert werden (192): Verschiedene Pseudomonasarten bauten dabei die angebotenen C_4 - C_{12} n-Alkansulfonsäuren über eine α -Hydroxylierung ab. Primärreaktion ist der Angriff einer Monooxygenase am α -C-Atom. Das instabile Folgeprodukt 1-Hydroxy-1-sulfonat-alkan zerfällt spontan unter Bildung eines Aldehyds und Bisulfit. Das bakterielle Enzym "n-Alkan-1-sulfonat-hydroxylase" benötigt für seine Aktivität O_2 und $NADH_2$. Endprodukte der Reaktion sind die entsprechende Alkansäure und Sulfat (192).

Zusammenfassend ergaben sich damit im Bereich lebender Organismen eine Fülle möglicher Abbauewege/Reaktionsmechanismen für Sulfonsäuren, die am Beispiel der Grünalge Chlorella fusca verifiziert werden sollten.

Die Klärung dieser Fragen sollte u.a. mithelfen, die bisher noch unbekannten Prozesse von **Aufnahme/Metabolisierung** natürlicher und künstlicher Sulfonsäuren in photosynthetisch aktiven **Algen** aufzuklären.

Ferner sollten die ökologischen und evolutiven **Vorteile der Sulfonatverwerter** gegenüber denjenigen Algen aufgedeckt werden, die nicht auf Sulfonsäuren als einziger S-Quelle wachsen können. So wäre denkbar, daß sporadisch auftretender Schwefelmangel im aquatischen System in einer Art "Sulfonsäurenische" überdauert werden könnte.

Andererseits sollten die folgenden Untersuchungen dazu beitragen, die bisher vernachlässigte Rolle der Algen beim **biologischen Abbau** dieser Substanzklasse im natürlichen System aufzuwerten. Sulfonatverwertende Algen könnten auch zur Mithilfe bei der **Abwasserreinigung** in Betracht gezogen werden. Chlorella fusca, beispielsweise, kann eine erstaunliche Vielfalt schwefelhaltiger Verbindungen als Schwefelquelle nutzen. Im Versuch wurden über 100 Mercaptide, Thioäther, Sulfatester, Sulfin- oder Sulfonsäuren metabolisiert (113). Doch Grünalgen wie Chlorella fusca besitzen zusätzlich zu dieser Abbaufähigkeit auch eine große strukturelle Stabilität aufgrund der Sporopolleninschicht in der äußeren Zellwand (6). Sie vermögen damit lysierende Stoffe (z.B. Detergentien) in solchen Konzentrationen zu überleben und abzubauen, die weit über den Grenzwerten des üblichen Klärschlammes liegen.

In Israel werden daher entsprechende Algenkulturen bereits großtechnisch in gut durchlüfteten Becken zur Abwasserreinigung/Produktion von eiweißreichen Tierfutters eingesetzt (7). Auch in Polen leistet Chlorella gute Dienste in der biologischen Reinigungsstufe hochverschmutzter Abwässer aus der Stickstoff-industrie (156) .

Es wäre daher durchaus sinnvoll, auch in Deutschland (Grün-)Algen verstärkt zur Abwasserreinigung heranzuziehen, sei es in Cokulturen mit Bakterien im Klärschlamm oder in Vorklärbecken zur Entfernung bakterienlysender Stoffe. Denkbar wäre auch ein Einsatz in speziellen Industriezweigen, z.B. der Papierindustrie, in der die schwer abbaubaren Ligninsulfonsäuren anfallen.

Mit diesen Überlegungen möchte die Arbeit anregen, Algen nicht nur als nützliche Objekte in der Grundlagenforschung anzusehen. Sie stellen darüber hinaus **hochpotente Destruenten** im natürlichen System dar und sollten mehr als bisher in den Entscheidungsprozeß angewandter Forschung miteinbezogen werden.

Wichtigstes Ziel der Untersuchungen war es jedoch, erstmalig **Sulfonsäureabbau** in photosynthetischen Organismen nachweisen zu können und anhand der Grünalge Chlorella fusca grundsätzliche **Mechanismen zur Aufnahme/Metabolisierung** dieser S-haltigen Verbindungen aufzuzeigen - ein wichtiger Beitrag zum globalen Schwefelzyklus und der Rückführung des Sulfonatschwefels in diesen Kreislauf.

B. Material und Methoden

2.1 Biologisches Material

Die meisten Untersuchungen wurden mit Chlorella fusca, Stamm 211-8b (169) der Algensammlung Göttingen durchgeführt (leicht kultivierbar; nachweislich gute Aufnahme/Metabolisierungsraten für Sulfonsäuren, hoher Bekanntheitsgrad der Stoffwechselprozesse).

Zu Vergleichszwecken wurden einige der Versuche auch mit anderen Organismen durchgeführt: Algen verschiedener phylogenetischer Abstammung, höhere Pflanzen. Herkunft dieser Organismen und ihre Kulturmedia sind in Tab.1 aufgeführt.

2.1.1 Anzuchtbedingungen

Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurde darauf geachtet, verwendete Kulturmedia und Kulturationsbedingungen möglichst wenig zu variieren. So wurden alle Blaualgen auf dem BG-11 Medium (185) und alle Grünalgen (Ausnahme: Dunaliella tertiolecta) auf dem SL-1 Medium (modifiziert nach 89) kultiviert.

BG-11 Medium

NaNO ₃	17.5 mM
Na ₂ CO ₃	0.4 mM
MgCl ₂	0.3 mM
Na ₂ SO ₄	0.3 mM
Citronensäure x H ₂ O	0.03 mM
K ₂ HPO ₄	0.02 mM
EDTA/MgCl ₂ (je)	0.0025 mM
Ammonium Eisen-III-citrat	6 mg
Spurenelemente ¹	

Spurenelemente in µMol: H₃BO₃ 46;
MnCl₂ x 4 H₂O 9.1; Na₂MoO₄ x 2 H₂O 1.61;
ZnSO₄ x 7 H₂O 0.77; CuSO₄ x 5 H₂O 0.32;
Co(NO₃)₂ x 2 H₂O 0.17 .

SL-1 Medium ("sulfur-less")

KNO ₃	5.0 mM
Mg(NO ₃) ₂ x 6 H ₂ O	2.0 mM
KH ₂ PO ₄	0.5 mM
K ₂ HPO ₄	0.5 mM
Na ₂ SO ₄	0.3 mM
Ca(NO ₃) ₂ x 4 H ₂ O	0.25 mM
EDTA/FeCl ₂ (je)	0.09 mM
Spurenelemente ¹	

Spurenelemente in µMol: H₃BO₃ 46;
Mn(NO₃)₂ x 4 H₂O 12.5; ZnCl₂ 0.73;
Cu(NO₃)₂ x 3 H₂O 0.31; Na₂MoO₄ x 2 H₂O
0.089 .

Tab.1: Herkunft der eingesetzten Organismen und ihre Kulturmedia

Organismen	Herkunft	Kulturmedium
<u>1. Cyanobakteria</u> - Plectonema 73110 - Anabaena cylindrica 7122 - Anabaena variabilis 7120 - Nostoc 6310 - Pseudanabaena 7408 - Spirulina 6313 - Synechococcus 6301 und 6312 - Xenococcus 7307 - Anabaena variabilis (Peter-Wolk Stamm)	Institute Pasteur (Paris) " Dr.Lockau (Regensburg)	BG-11 Medium " "
<u>2. Euglenophyceae</u> - Euglena gracilis	Dr.Kudielka (München)	(71)
<u>3. Bacillariophyceae</u> - Navicula pelliculosa 1050-3	Algensammlung Göttingen	(168)
<u>4. Rhodophyceae</u> - Cyanidium caldarium III-D-2 - Porphyridium cruentum 1380-1	Dr.habil Köst (München)	(3) (105)
<u>5. Chlorophyceae</u> a) <u>Volvocales</u> - Chlamydomonas reinhardtii 11-32a - Dunaliella tertiolecta b) <u>Chlorococcales</u> - Chlorella fusca 211-8b - Chlorella fusca 211-11n - Chlorella kessleri 211-11h - Chlorella saccharophila 211-9a - Chlorella sorokiniana 211-8k - Chlorella vulgaris 211-1e - Haematococcus vulgaris 211-11c - Coelastrum proboscideum 217-2 - Pediatrum boryanum 85.81 - Scenedesmus obliquus 276-3a - Scenedesmus communis 276-4b - Scenedesmus armatus, var. subalternus 276-4a - Chlorella K	Algensammlung Göttingen Algensammlung Göttingen " " " Frau v.Bülow (München)	SL-1 Medium (132) SL-1 Medium " " " "
<u>6. Höhere Pflanzen</u> - Lemna minor - Zellkulturen von a) Helianthus annuus b) Nicotiana tabacum c) Pimpinella anisum	Dr.Brunold (Bern) Dr.Kudielka (München)	(25) (114)

Anmerkung: Die Cyanobakterien-Stämme wurden anhand ihrer PCC-Nummer (Institute Pasteur, Paris) aufgelistet (163), die übrigen Algenstämme anhand ihrer SAC-Nummer (Sammlung von Algenkulturen, Göttingen) (169/170).

Alle Medien wurden bei 110 °C und 1.2 atm. autoklaviert. Die Zeit im Autoklaven betrug 20 Minuten (bis zu einem Volumen von 100 ml), bzw. 40 Minuten bei einem Volumen von 1 l.

Bei Wachstumsversuchen auf Sulfonsäuren ersetzten diese, zumeist in Form ihrer Na-Salze, den üblichen Sulfatgehalt des Mediums. "S-Mangel-Medien" enthielten keinerlei Schwefelzusatz, wohingegen "N-Mangel-Medien" bzw. N/30-Medien bis zu 0.25 mM KNO₃ enthalten konnten.

Algenstammkulturen wurden in 100-300 ml Erlenmeyer-Kolben am Rundschüttler bei 25 °C und Licht gezogen. **Algenmassenkulturen** ("Batch-Kulturen") erhielt man in 1l-Pirsonflaschen in einem Kniese-Kulturapparat bei 27 °C und 10 000 Lux (mit Ausnahme von Chlorella sorokiniana 211-8k und Synechococcus 6301, die beide bei 37 °C angezogen wurden). Alle Pirsonflaschen wurden mit minimalen Algenmengen angeimpft (Grünalgen 100 µl; Blaualgen 2 ml), um ein Überschleppen von Sulfat, Nitrat bzw. anderer Stoffe aus der Stammkultur zu vermeiden, und mit Preßluft, ohne CO₂-Zusatz, für 4-5 Tage steril begast.

Kulturen in **organischen** Medien wurden aus Gründen der Sterilität unbelüftet in 300 ml Erlenmeyer-Kolben (100 ml Medium) für 2-4 Wochen bei 25 °C im belichteten Rundschüttler angezogen. Dies betraf: Chlorella saccharophila (0.5 % Glucose), Euglena (0.5 % Glutaminsäure) und Zellkulturen (2 % Saccharose im Medium).

Lemna minor wurde ungeschüttelt in 300 ml Erlenmeyer-Kolben (100 ml Medium) für 2-4 Wochen im Licht kultiviert.

2.1.2 Ernte der Organismen

Die Organismen wurden zu den oben angegebenen Zeitpunkten abgeerntet (2.1.1).

Algenkulturen: Nach Bestimmung des Gesamtvolumens wurden der gut durchwirbelten Suspension mehrere Proben zur Zellzahlbestimmung, Messung der optischen Dichte bei 680 nm (als Maß für die Wachstumsdichte), sowie zur Bestimmung von Frisch- und Trockengewicht entnommen. Die restliche Algensuspension wurde jeweils für 10 Minuten in einer Runne-Zentrifuge bei 3000 g und für 15 Minuten in einer Sorvall-Zentrifuge bei 14 000 g abzentrifugiert.

Der Niederschlag wurde in 5-fachem Volumen des Frischgewichtes (w/v) aufgenommen entweder in 0.1 M Phosphat-Puffer, pH 8.0 oder in sogenanntem "Aufbrechpuffer" (0.1 M Tris/HCl pH 8.0, 0.1 M MgCl₂ -10 mM Mercaptoäthanol als Oxidationsschutz) und zur Chlorophyllbestimmung herangezogen (2.4.1).

Alle Zellkulturen wurden freundlicherweise von Dr.A.Kudielka kultiviert und im Anschluß daran ausgewertet (Zellzahlbestimmung).

Vorbehandlung: Nach 2-3 Wochen Wachstum wurden 3 x 5 ml der gut durchwirbelten Suspension entnommen. Die Proben wurden scharf abzentrifugiert, mit je 5 ml 15 %iger TCA versetzt und nach 15-minütiger Einwirkung der TCA in einem Potter vorsichtig zu Einzelzellen homogenisiert. Zellzahlbestimmung siehe 2.1.3.

Lemna minor-Kulturen wurden über ein Sieb abgeerntet, gut mit Wasser/Medium gewaschen und per Hand ausgezählt.

2.1.3 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer'schen Erythrocyten-Zählkammer mit einer Kammertiefe von 0.1 mm und einer Kammerfläche von 1 mm². Sie wurde unter Berücksichtigung statistischer Sachverhalte wie üblich auf die Zellzahl/Kultur hochgerechnet.

Zur Bestimmung des Frisch/Trockengewichtes einer Algenzelle wurden definierte Mengen der Algensuspension (meist 3 x 10 ml) in zuvor abgewogenen Reagenzgläsern scharf abzentrifugiert und nach kurzer Lufttrocknung (Frischgewicht) oder nach 4-stündigem Aufenthalt bei 110 °C im Trockenschrank erneut abgewogen.

2.1.4 Rohextraktgewinnung

Bei Algen erfolgte der Zellaufschluß mit Hilfe der French Pressure Cell Press bei 12 000 PSI (1 PSI = 7 kPa), nachdem die frisch abgeernteten Kulturen in 5-fachem Volumen des Aufbrechpuffers aufgenommen worden waren (siehe 2.1.2). Nach 3-maligem Frenchpressen waren mindestens 95 % der Zellen aufgeschlossen, wie eine vorsorglich durchgeführte lichtmikroskopische Überprüfung der Extrakte ergab. Abschließend folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 14 000 g in einer vorgekühlten Sorvall-Zentrifuge.

Das Pellet (Membranpartikel) wurde zumeist verworfen; der klare, grüne Überstand (bei Mangelzellen farblos bis gelb-orange) wurde im Eis aufbewahrt und als "Rohextrakt" in eine Vielzahl enzymatischer Tests eingesetzt.

Der Zellaufschluß bei Lemna minor erfolgte durch Zerreiben in einer Porzellanschale und Aufnehmen in frischen "Aufbrechpuffer".

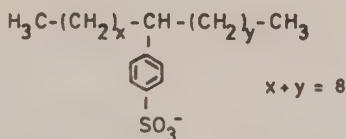
2.2 Chemikalien

2.2.1 Unmarkierte Sulfonsäuren

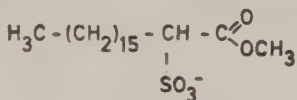
Käuflich erhältlich waren: Methan-und Äthansulfonsäure, 2-Hydroxyäthansulfonsäure (Merck, Darmstadt), C₃-C₁₀ n-Alkan-1-sulfonsäuren, Aminomethansulfonsäure, Benzolsulfonsäure, p-Phenolsulfonsäure und p-Toluolsulfonsäure (Fluka AG, Buchs, Schweiz), sowie 2-Mercapto-äthansulfonsäure von Pierce Eurochemie (Rotterdam, Holland). Sulfanilsäure stammte von Roth (Karlsruhe); Sulfanilsäure und L-Cysteinsäure von Serva (Heidelberg), Taurin (2-Amino-äthansulfonsäure), 3-Amino-1-propansulfonsäure, sowie D,L-Homocystein von Sigma (St.Louis, USA).

Die Firma Henkel (Düsseldorf) stellte freundlicherweise folgende Detergentien auf Sulfonsäurebasis zur Verfügung :

Lineares Alkyl-
benzolsulfonat (LAS)
Molekülmasse 323 g/Mol



α -Talgfettsäure-
methylestersulfonat
Molekülmasse 390 g/Mol



Sulfoessigsäure, Sulfopropionsäure und 1,2-Diäthansulfonsäure wurden von Dr. H.-P.Köst, Botanisches Institut, München, aus ihren reduzierten Vorstufen (2-Mercaptoessigsäure, 3-Mercaptopropionsäure und 1,2-Diäthanthiol) synthetisiert. Als Oxidationsmittel diente Kaliumpermanganat. Die Sulfonsäuren lagen in Form ihrer K-Salze vor und enthielten Sulfat.

Alle Sulfonsäuren wurden auf Sulfat-Verunreinigungen durch Zugabe einer 0.1 M Bariumacetat-Lösung getestet. Beobachtete man BaSO₄ als Trübung bzw. als weißen Niederschlag, so wurde das insgesamt vorhandene Sulfat mit höherkonzentriertem Bariumacetat ausgefällt. Nach Abzentrifugation des Niederschlages wurden die überschüssigen Bariumionen über eine Dowex 1 x 50 Säule mit Wasser entfernt.

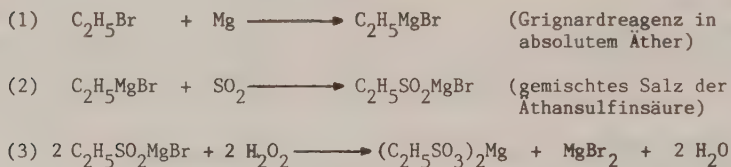
2.2.2 Markierte Sulfonsäuren

^{35}S -Taurin und ^3H -markiertes Taurin wurden von Amersham-Buchlar (Braunschweig) bezogen. ^{35}S -markierte Äthansulfonsäure wurde freundlicherweise von Dr. Köst, Botanisches Institut, München nach einer modifizierten Technik von Houlton und Tartar (91) synthetisiert.

2.2.2.1 Synthese der ^{35}S -markierten Äthansulfonsäure

a) Theorie

Ausgangspunkt der Synthese war die Umsetzung von Äthylbromid mit metallischem Magnesium zu Äthylmagnesiumbromid in wasserfreiem Äthyläther (Reaktion 1). Das Grignard-Reagenz wurde unter flüssigem Stickstoff über Nacht mit ^{35}S - SO_2 zu Äthansulfinsäure umgesetzt (2) und anschließend im wässrigem Medium mit Hilfe von H_2O_2 zur gewünschten Äthansulfonsäure aufoxidiert (Reaktion 3).



b) Praktische Durchführung

(1) Darstellung des Äthylmagnesiumbromids nach Grignard

Apparatur: Dreihalskolben mit Tropftrichter, Magnetrührer und Rückflußkühler (mit CaCl_2 -Rohr)

Chemikalien: 0.1 Mol Magnesium-Späne
0.1 Mol Äthylbromid
35 ml absoluten Äther

Absolutieren des Äthers: Absoluter Äther wurde durch mehrtägiges Stehen über Calciumchlorid, Abfiltrieren und Einpressen von Natriumdraht erhalten.

Grignard-Reaktion: Magnesiumspäne wurden vor Versuchsbeginn für eine Stunde

im Trockenschrank bei 70-80 °C getrocknet und zur Erhöhung der Reaktionsbereitschaft in einer Reibschale zerrieben.

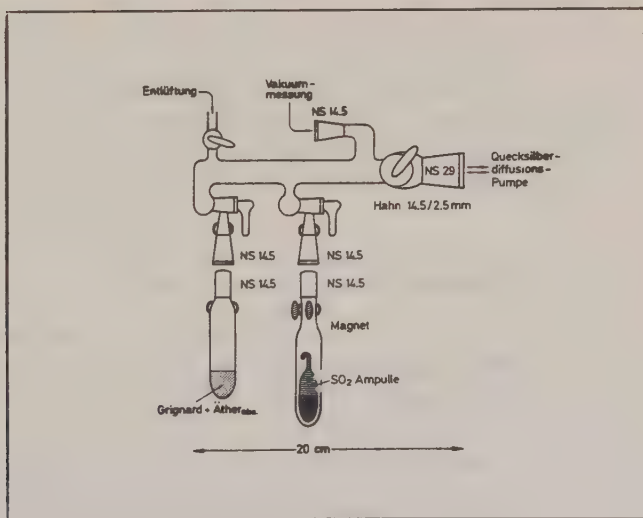
Die noch warmen Mg-Späne wurden in den Dreihalskolben gegeben und mit 10 ml Äther übergossen. Anschließend wurde die Mischung unter Rühren mit 0.5 g des Äthylbromids versetzt. Nach Zugabe einiger Tropfen Tetrachlorkohlenstoff sprang die Reaktion an und das restliche Äthylbromid, gelöst in 25 ml absoluten Äther, wurde unter weiterem Rühren so zugetropft, daß der Äther gelinde siedete. Gegen Ende des Eintropfens wurde das Gemisch auf einem Wasserbad leicht erhitzt, bis praktisch alles Magnesium gelöst war (1.5 Stunden). Das gebildete Äthylmagnesiumbromid wurde von den restlichen Magnesiumflittern abdekantiert und in einer gut schließenden Schraubflasche über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt (unter Stickstoff).

(2) Umsetzung der Grignard-Verbindung mit ^{35}S -Schwefeldioxid

Apparatur:

Spezial-
anfertigung

Abb.1:



Chemikalien: 0.237 mMol $^{35}\text{S}-\text{SO}_2$ (207 MBq)
0.474 mMol $\text{C}_2\text{H}_5\text{MgBr}$ ($\approx$ 2-facher Überschuß)

Reaktionsverlauf: Die SO_2 -Ampulle wurde in das SO_2 -Rohr gestellt und dieses in ein Gefäß mit flüssigem Stickstoff getaucht. An der zweiten Öffnung wurde ein Schliffrohr mit 107.8 μl Äthylmagnesiumbromid in absolutem Äther befestigt.

Danach wurde die Öl/Hg-Dampfpumpe eingeschaltet. Nach Erhalt des Klebevakuums wurde der flüssige Stickstoff vom SO_2 -Rohr entfernt und das zweite Schliffrohr mit Äthylmagnesiumbromid gekühlt. Kurze Zeit später wurde mit Hilfe des zuvor eingebrachten Magneten das Häkchen an der SO_2 -Ampulle zerschlagen und damit das Gas freigesetzt. Dieses schlug sich an der Glaswand nieder und wurde über Nacht in den Grignard einkondensiert, wo es mit $\text{C}_2\text{H}_5\text{MgBr}$ allmählich zu $\text{C}_2\text{H}_5\text{SO}_2\text{MgBr}$ reagierte, dem gemischten Salz der Äthansulfinsäure.

Nach 12 Stunden verblieb ein weißlich grauer Niederschlag im Reaktionsgefäß, der den Hauptteil der Radioaktivität enthielt.

Sicherheitsmaßnahmen: Die Reaktion wurde im Abzug durchgeführt. Zum Schutz gegen die Strahlung wurde eine 2 cm dicke Bleiplatte aufgestellt und nur mit Handschuhen/Bleischürze gearbeitet.

(3) Umsetzung des Reaktionsproduktes $\text{C}_2\text{H}_5\text{SO}_2\text{MgBr}$ mit H_2O_2

Der Niederschlag wurde in 0.5 ml Eis und 15 Tropfen Eisessig gelöst. Nach Zugabe eines Tropfens H_2O_2 wurde die Oxidation zur Äthansulfonsäure durchgeführt.

Die so erhaltene ^{35}S -markierte Äthansulfonsäure war nicht rein. Sie enthielt Verunreinigungen an ^{35}S -haltigem Sulfit/Sulfat und weiteren ^{35}S -Verbindungen aus der nachträglichen Umsetzung von Äthansulfinsäure mit dem Grignard-Reagenz (z.B. Diäthylsulfoxid/Diäthylsulfon) und mußte nachgereinigt werden.

2.2.2.2 Aufreinigung der ^{35}S -Äthansulfonsäure

Die Nachreinigung der ^{35}S -Äthansulfonsäure erfolgte dünnschichtchromatographisch mit Hilfe selbstgezogener präparativer Kieselgel GF₂₅₄-Platten (2.5.1).

Als Laufmittelsystem diente i-Propanol : NH_3 : H_2O = 20:1:4, da sich in diesem System Äthansulfonsäure (R_f = 0.57) sowohl von Sulfit/Sulfat (R_f = 0) als auch von Diäthylsulfoxid/Diäthylsulfon (R_f = 0.77) abtrennen ließ.

Die Auswertung der Platten erfolgte mit DC-Scanner bzw. mit dem Zählrohr, sowie durch Co-chromatographie mit authentischer Äthansulfonsäure und nachfolgender Anfärbung der Sulfonsäuren mit Silberfluoresceinat (2.4.3.1).

Die Elution der ^{35}S -Sulfonsäure aus dem Gel erfolgte in einem Rundkolben im Abzug mit wenig Wasser. Sie wurde bei - 16 °C eingefroren und bis zum Gebrauch in einem Bleibehälter aufbewahrt.

2.2.2.3 Aufreinigung von ^{35}S -Taurin

Kaufliches ^{35}S -Taurin enthielt über 10 % ^{35}S -Verunreinigungen, zumeist in Form von Sulfit/Sulfat und wurde daher dünn-schichtchromatographisch nachgereinigt. Als Laufmittelsystem diente Äthanol : Wasser = 70:30, ein System, in dem sich ^{35}S -Taurin ($R_f = 0.77$) relativ schnell von den Verunreinigungen Sulfit/Sulfat ($R_f = 0$) abtrennen ließ, die auch in diesem Laufmittelsystem an der Startlinie verblieben (siehe 2.2.2.2).

Die Auswertung der Platten erfolgte mit DC-Scanner (Co-Chromatographie) oder durch partielle Anfärbung mit Ninhydrin (2.4.3.2).

Die Gelbände mit aufgereinigtem ^{35}S -Taurin wurde nach dem Abkratzen im Abzug bei Zimmertemperatur aufbewahrt (Rundkolben) und bei Bedarf sukzessive eluiert.

2.2.3 Sonstige Chemikalien

^{35}S -Methionin, ^{35}S - Na_2SO_4 und ^{35}S -Schwefeldioxid stammten von Amersham-Buchlar (Braunschweig); Arsenat von Baker (Groß-Gerau); Biorad Protein Assay von Biorad (Richmond, USA) und ATP von Fa.Boehringer-Mannheim. Von Firma Roth (Karlsruhe) wurden Saccharose, Äthylacetat, Dithioerythrit (DTE), Essigsäure, Isopropanol, Methanol, Aceton, sowie Rotisint 22 bezogen. Von Sigma (St.Louis, USA) waren L- und β -Alanin; Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Rinderserumalbumin und D- bzw. L-Cystein stammten von Serva (Heidelberg).

Alle übrigen, nicht einzeln aufgeführten Chemikalien waren von Merck (Darmstadt).

2 . 3 G e r ä t e

-- Photometer

Beckman Spektralphotometer DU-7

Bildschirmausdruck war möglich über den angeschlossenen

Hewlett-Packard Plotter 2672 (Corvallis, USA)

-- Zentrifugen

- Labofuge GL von Heraeus-Christ (Osteroede)

- Runne Zentrifuge (Runne, Heidelberg)

- WKF-Zentrifuge G 50 K (Brandau, Darmstadt)

- Sorvall Superspeed RC-2 B (Du Pont Instruments, Bad Nauheim)

- Autoklav
Dampfsterilisator Vapiklav 400 E (Sterico AG, Dieticon, Schweiz)
Dampfsterilisator der Firma Denit (Berlin-Charlottenburg)
- French-Press
French Pressure Cell Press (American Instrument Company,
Silver Springs, Maryland, USA)
- Algenanzuchtkästen
Sonderanfertigung eines Kniese-Kulturapparates für 1 l Pirson-
flaschen, Ø 6.5 cm, Beleuchtungsstärke 10000 - 12000 Lux
- Mikroskop
Leitz HM-Lux 3 (Leitz, Oberkochen)
- Waagen
Analysenwaage: Mettler H 54 (Mettler, Gießen)
Feinwaage der Fa.Sartorius
- pH-Meter
Digital pH-Meter 646 (Bachhofer, Reutlingen)
- Wasserbad
Thermomix 1420 (Braun, Melsungen)
- Für die Dünnschichtchromatographie
Mixer: Starmix der Firma Braun (Melsungen)
Streichgerät: CAMAG-Streichgerät (Muttenz, Schweiz)
- Für die Dünnschichtelektrophorese
CAMAG-Elektrophoresekammer (Muttenz, Schweiz)
Netzgerät 493 von ISCO (Lincoln, USA)
CAMAG-Sprühkabinett (Muttenz, Schweiz)
- UV-Lampe
CAMAG-Universal-UV 29200 Lampe für 254 nm oder 355 nm
(Muttenz, Schweiz)
- WARBURG-Apparat
Apparat, Manometer und Reaktionsgefäße stammten von der Firma
B.Braun (Melsungen)

-- Flüssigkeits-Szintillationszähler

BETAmatic I der Firma Contron

Meßdauer : 2 Minuten oder 800 000 Impulse

³⁵S-Messungen im ¹⁴C-Kanal: 9-150 KeV

³H-Messungen: 3.6-18 KeV

-- Zählrohr

Durchflußzählrohr FHT 650 B1 und Netzgerät FHT 700 B der

Firma Friesseke und Hoepfner (Erlangen-Bruck)

Zähldauer: 1 Minute oder 900 000 Impulse

Zählgas: Methan/Argon (9:1) -Gemisch (Linde, Höllriegelskreuth)

-- DC-Scanner

Berthold-LB 2031/2730 DC-Scanner II-Autochron (Wildbad)

Empfindlichkeit 100 mV

Zählgas: Methan/Argon-Gemisch (9:1)

Ausdruck erfolgte über den Schreiber der Fa.Berthold (Wildbad)

Linear instruments corp., Modell 355/385, Papierbreite 25 cm

-- Alle Glasgeräte von Fa.Schott (Mainz)

2.4 Chemische Nachweisverfahren

2.4.1 Chlorophyllbestimmung

Die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes einer Algenkultur erfolgte aus der konzentrierten Zellsuspension nach Abernten der Kulturen (2.1.2) und Aufnahme der Zellen in 0.1 M Phosphatpuffer, bzw. Aufbrechpuffer, pH 8.0.

Nach der Methode von ARNON (5) wurde ein Aliquot der möglichst homogenen Algen-suspension je zweimal 5 Minuten mit Methanol bei 80 °C extrahiert und scharf abzentrifugiert. Die vereinigten Überstände wurden zumeist auf 10 ml aufgefüllt und über Extinktion bei 645 nm und 663 nm gegen Methanol quantitativ bestimmt. Der Chlorophyllgehalt konnte danach unter Berücksichtigung der Verdünnung nach der von ARNON aufgestellten Formel ermittelt werden:

$$\text{mg Chl.} = \text{Vol(ml)} \times \text{Verdünnungs-} \times \frac{20.2 \times E_{645} + 8.02 \times E_{663}}{1000}$$

2.4.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte über den BIORAD-Protein Assay, der auf Anlagerung löslicher Proteine an den Coomassie-Brilliant Blue G 250-Farbstoff beruhte (20). Der gebildete Farbstoff war eine Stunde stabil und konnte im Photometer bei 678 nm gegen den Nullwert ohne Protein bestimmt werden.

Die Eichkurve wurde mit Rinderserumalbumin (RSA) erstellt. Der Test war linear im Bereich von 8 µg-27 µg Protein; höhere Proteingehalte konnten nach Vorverdünnung mit Wasser gemessen werden.

2.4.3 Nachweisreagenzien

In diesem Unterkapitel sollen vor allem Sprühreagenzien, die zum qualitativen Nachweis von Substanzen auf DC/DE-Platten Verwendung fanden, besprochen werden. Reagenzien, die gleichzeitig auch eine quantitative Bestimmung der Substanzen erlaubten, werden dagegen etwas später abgehandelt (2.4.4-2.4.9).

2.4.3.1 Sulfonsäurenachweis

Zwei der in (40) aufgeführten Nachweisreagenzien, Silberfluoreszinat und der Säure-Basen Indikator Bromkresolgrün, erwiesen sich besonders geeignet für den Nachweis aliphatischer Sulfonsäuren. Pinakrytolgelb dagegen, das in 0.1 %iger (w/v) Lösung aufgesprüht Sulfonsäuren als gelb/braune Flecken im UV-Licht nachweisen sollte, war nur für Arylsulfonsäuren in höheren Konzentrationen geeignet.

a) Silberfluoreszinat

Dieses effektive Nachweisreagenz für Sulfonat-Anionen (1-5 µg), aber auch für Sulfat und Sulfamat bestand aus einer Mischung von 1 Teil 10 %iger wässriger AgNO₃-Lösung und 5 Teilen 0.2 % Natriumfluoreszinat in absolutem Äthanol. Das fertige Reagenz war nicht haltbar und mußte unmittelbar vor dem Ansprühen jeweils frisch angefertigt werden. Die aliphatischen Sulfonsäuren erschienen neben Sulfat als gelbe Flecken auf pinkfarbenem Untergrund und bleichten im Licht langsam aus.

b) Bromkresolgrün

Dieses Sprühreagenz enthielt 0.04 g Bromkresolgrün in 100 ml Äthanol mit 0.1 N NaOH bis zur auftretenden Blaufärbung versetzt. Sulfonsäuren bildeten gelbe Flecken auf blauem Hintergrund und wurden besonders gut in Form ihrer Ammoniumsalze nachgewiesen (siehe 2.2.2/2.5.1 - Ammoniak war in den meisten Laufmittelsystemen der DC-Analysen enthalten).

2.4.3.2 Aminosäurenachweis

Die β -Aminosäure Taurin wurde gemeinsam mit α -Aminosäuren, Di- und Tripeptiden durch Aufsprühen einer 0.5 %igen äthanolischen Ninhydrin-Lösung nachgewiesen. Beim anschließenden Erhitzen der DC/DE-Platten im Trockenschrank auf 110 °C für 10 Minuten bildeten sich langsam violette Flecken von Ruhemann's Purpur auf hellem Untergrund (113).

2.4.3.3 Lipidnachweis

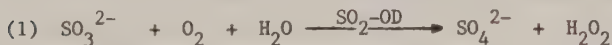
Zur Visualisierung von polaren Lipiden wie z.B. Phosphatidyläthanolamin diente eine 0.006 %ige wässrige Rhodamin 6 G-Lösung, die kurz vor dem Aufsprühen 1:1 mit einer 8 %igen NaOH-Lösung gemischt wurde.

Die aufgetrennten Lipide konnten unter der UV-Lampe deutlich als gelbe Flecken auf dunkelblauem Untergrund identifiziert werden.

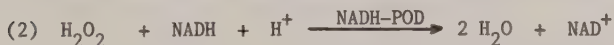
2.4.4 Sulfitbestimmung

Dieser Zwei-Stufen-Test wurde als Kombinationssatz von Boehringer-Mannheim, Bestell-Nr. 725 854 komplett angeliefert und beruhte auf folgenden Prinzipien.

- Sulfit wurde in Gegenwart von Sauerstoff durch eine Sulfit-Oxidase ($\text{SO}_2\text{-OD}$) zu Sulfat aufoxidiert



- Das bei dieser Reaktion entstehende H_2O_2 wurde in Gegenwart von NADH durch das Enzym NADH-Peroxidase (NADH-POD) reduziert



Die verbrauchte NADH-Menge war äquivalent zur Sulfitmenge in (1). NADH-Verbrauch war damit die eigentliche Meßgröße und wurde aufgrund der Absorptionsabnahme bei 340 nm/Zeit bestimmt.

Der Test war linear im Bereich von 3-30 μg Sulfit/3.06 ml Testvolumen, so daß meist nur ein Aliquot der zu bestimmenden Probe in den Test eingesetzt wurde.

2.4.5 Sulfatbestimmung

Der Sulfatnachweis wurde im allgemeinen über die Wanderung von ^{35}S -Sulfat in der Dünnschichtelektrophorese geführt, da sich photometrische Nachweismethoden als ungeeignet erwiesen.

2.4.6 Sulfidbestimmung

Die Sulfidbestimmung erfolgte über die Bildung von Methylenblau aus Schwefelwasserstoff und Dimethyl-p-phenylendiamin, dessen Intermediärprodukt durch Eisen-III-Ionen zu Methylenblau oxidiert werden konnte (147, 180).

Zur sulfidhaltigen Probe wurden je 100 μl

- 0.02 M NN'-Dimethyl-p-phenylenammoniumchlorid in 7.2 N HCl
- 0.03 M FeCl_3 in 1.2 N NaOH

einpipettiert und nach 20-minütiger Reaktionszeit im Dunkeln bei 670 nm gegen einen Nullwert ausgemessen.

2.4.7 Cysteinbestimmung

Cystein ließ sich durch die Ninhydrinreaktion unter extrem sauren Bedingungen spezifisch anfärben und nachweisen (113, 152).

Nach Zugabe von 1 ml des Gaitonde-Reagenz (1.25 g Ninhydrin, gelöst in 20 ml konz. HCl und 80 ml Eisessig) wurden die cysteinhaltigen Proben 10 Minuten im Wasserbad gekocht, wobei die Reagenzgläser mit Glasmurmeln abgedeckt waren. Es bildete sich ein roter Farbkomplex, der nach Abkühlung und Zugabe von 2 ml n-Butanol zur Stabilisierung dieses Komplexes bei 560 nm gegen einen Nullwert ohne Cystein bestimmt wurde. Über den mitgeführten Eichwert (100 nmol Cystein) konnte die Cysteinmenge/Probe berechnet werden.

2.4.8 Bestimmung von Carbonylgruppen

Der kolorimetrische Nachweis von Carbonylgruppen erfolgte durch Zugabe von 2,4-Dinitrophenylhydrazin (76). Die in saurer Lösung entstehenden 2,4-Dinitrophenylhydrazonderivate bildeten nach Basenzusatz chinoide Strukturen und zeigten ein Absorptionsmaximum bei 520 nm.

Durchführung: 300 μl 2,4-Dinitrophenylhydrazin (0.1 % in 2 N HCl) wurden zur aldehydhaltigen Probe pipettiert, 15 Minuten bei 37 °C inkubiert, nach Zugabe von 2.5 ml 1 N NaOH gestoppt/gefärbt und im Photometer bei 520 nm bestimmt.

2.4.9 Phosphatbestimmung

Die Phosphatbestimmung erfolgte durch Zugabe eines spezifischen Phosphatreagens (28). Diese Lösung wurde kurz vor Gebrauch frisch hergestellt und bestand aus:

- 25 ml FeSO_4 -Lösung (8 g FeSO_4 in 96 ml H_2O und 4 ml 4.5 M H_2SO_4)
- 25 ml 4.5 M H_2SO_4
- 25 ml $(\text{NH}_4)_5\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times \text{H}_2\text{O}$ (6.6 g in 100 ml H_2O)
- 125 ml H_2O bidest.

Das im Reagenz enthaltene Heptamolybdat bildete mit Phosphat in saurer Lösung Heteropolysäuren, die durch Fe-II-Ionen zu einer blaugefärbten Einlagerungsverbindung reduziert werden konnten.

Nach 10 Minuten Reaktionszeit wurde die Probe bei 578 nm gegen den Blindwert gemessen und über die Eichkurve (50 nmol - 1 μmol Phosphat) in den Phosphatgehalt/Probe umgerechnet.

2.4.10 Bestimmung des Fettgehaltes

Die in der Probe enthaltenen Lipide wurden durch Extraktion in der Siedehitze abwechselnd mit Methanol und nicht-wasserlöslichen Lösungsmitteln erhalten (1). Nach Bestimmung von Zellzahl, Frisch- und Trockengewicht der Algen wurden die Kulturen wie üblich geerntet und konzentriert (2.1.2). Das erhaltene Pellet wurde quantitativ in einen 50 ml Rundkolben überführt und am Rückflußkühler in der Siedehitze unter Einsatz folgender Extraktionsmittel gekocht:

- 1/2 Std. mit 30 ml Chloroform/Methanol (2:1)
- 1/2 Std. mit 25 ml 90 %igem Methanol
- 1/2 Std. mit 30 ml absolutem Methanol
- 1 Std. mit 25 ml Petroläther (60-80)
- 1/2 Std. mit 20 ml absolutem Methanol
- 1 Std. mit 30 ml Äther
- über Nacht mit 30 ml Äther

Danach wurden die gesammelten Fraktionen im Rotationsverdampfer eingeeengt und im Dunkeln bei 40 °C getrocknet. Der Rückstand wurde mit Petroläther/Benzol (14:1) aufgenommen und in einen vorgewogenen Kolben filtriert. Nach Vertreiben des Lösungsmittels wurde das Gewicht des Extraktes bestimmt.

2.4.11 Bestimmung des Stärkegehaltes

Die Algen wurden wie angegeben (2.1) abgeerntet und aufgeschlossen (French-Presse). Nach dem Abzentrifugieren bei 14 000 g wurden Überstand und Pellet getrennt in die Stärke(Zucker-)bestimmung eingesetzt.

1 ml Überstand/1 g Pellet wurden mit 5 ml 1.1 %iger HCl-Lösung für 30 Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach dieser Säurehydrolyse wurden die Proben abgekühlt, mit 1 N NaOH auf pH 5 eingestellt und auf 50 ml in einem Meßkolben aufgefüllt. Dieser stark verdünnten Lösung wurden 2 ml entnommen und mit 1 ml 0.1 M Natriumacetat-Puffer, pH 4.6 versetzt. Nach Zugabe von 100 µl (10 mg auf 1 ml Wasser) α -Amyloglycosidase-Lösung wurden die Proben für 30 Minuten bei 40 °C im Wasserbad inkubiert.

Die Bestimmung der freigesetzten Glucose erfolgte mit Hilfe des Glucose-Reagenz von Boehringer-Mannheim: 10 µl der Probe wurden mit 250 µl Glucosereagenz für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 440 nm gegen einen Nullwert photometrisch bestimmt.

2.5 Trennverfahren

2.5.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Material

Zur dünnenschichtchromatographischen Auftrennung von Substanzen wurden zumeist selbstgezugene Kieselgel-GF₂₅₄ Platten verwendet.

Platten für analytische Zwecke besaßen dabei eine Schichtdicke von 0.25 mm, präparative Platten von 0.5 mm. Zu ihrer Herstellung wurden 50 g Kieselgel in 100 ml Wasser (bzw. 80 g Kieselgel mit 140 ml Wasser) kurz im Mixer gemischt und mit Hilfe des CAMAG-Streichgerätes auf jeweils vier, gut mit Äthanol gesäuberte Glasplatten (20 x 20 cm) verteilt. Nach dem Lufttrocknen wurden die Platten 30 Minuten lang bei 110 °C im Trockenschrank aktiviert.

Zur Lipidauftrennung wurden käufliche HPTLC-Kieselgel 60-F₂₅₄ Platten der Fa. Merck (Darmstadt) benutzt.

Durchführung

Die mit Proben versehenen DC-Platten wurden bei Zimmertemperatur in mit Filterpapier ausgeschlagenen Glaskammern entwickelt.

Als Laufmittelsysteme dienen :

System A: i-Propanol : NH_3 : H_2O = 20:1:4

System B: i-Propanol : NH_3 : H_2O = 6:3:1

System C: Aceton : Benzol : H_2O = 91:30:8

System D: Äthanol : H_2O = 70 : 30

Detektion

Die hierbei erzielten Trennergebnisse wurden mittels UV-Löschung, Messung der Radioaktivität oder nach Ansprühen mit geeigneten Nachweisreagenzien sichtbar gemacht:

UV-Löschung/Fluoreszierende Substanzen wurden mit der CAMAG-Universal-UV-Lampe bei 254 nm/355 nm beobachtet

Radioaktive Substanzen wurden mit DC-Scanner bzw. mit dem Zählrohr ausgemessen

Verwendete Nachweisreagenzien waren (2.4.3)

- . Silberfluoreszinat/Bromkresolgrün für Sulfonsäuren
- . Ninhydrin für Aminosäuren (einschl. Taurin)
- . Rhodamin 6G für polare Lipide

Elution

Analytische Plattenläufe wurden 2 cm-weise aus dem abgekratzten Kieselgel eluiert (2 x 500 μl), im Szintillationszähler bestimmt (Aliquot) bzw. für weitere Untersuchungen eingesetzt.

Präparative Plattenläufe wurden nach Identifikation der Substanzen bandenweise wie angegeben, im Abzug eluiert (2.2.2.2/2.2.2.3).

2.5.2 Dünnschichtelektrophorese (DE)

Zur Elektrophorese wurden zumeist Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten der Firma Merck (Darmstadt) verwendet.

Nach dem Probenauftrag wurden die Platten im CAMAG-Sprühkabinett mit dem jeweiligen Elektrophorese-Puffer befeuchtet. Die Trennung der Substanzen erfolgte bei konstanter Spannung von 500 V (25 V/cm) und 14 °C für 30-40 Minuten.

Als Elektrophorese-Puffer dienen:

System E: Ameisensäure/Essigsäure/Wasser = 78:25:897

System F: 0.1 M Citratpuffer, pH 5.8

Um den Verlauf der Auftrennung auch visuell verfolgen zu können, wurden farbige Marker eingesetzt. So wanderte K_2CrO_4 gleich schnell wie das unsichtbare Sulfation ($\text{SO}_4^{2-}/\text{Cr}_4^{2-}$) zur Anode und der blaugefärbte $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4$ -Komplex lief nach Umkomplexierung im Citratpuffer parallel zur Äthansulfonsäure in Richtung Anode.

Nach Trocknen der Platten bei 110 °C im Trockenschrank wurden sie mit Hilfe der entsprechenden Nachweisreagenzien entwickelt (2.4.3), eluiert und im Szintillationszähler radioaktiv vermessen.

2.5.3 Gaschromatographie

a) Bestimmung von Äthan/Äthen

Die gaschromatographische Bestimmung von Äthan/Äthen im Anschluß an die in 7.4 aufgelisteten Untersuchungen zum Sulfonsäureabbau im zellfreien System wurden im Labor von Prof.Dr.Elstner, TU-München, durchgeführt.

b) Bestimmung von Fettsäuren

Die Bestimmung der in Chlorella fusca vorkommenden Fettsäuren bei Variation der S/N-Ernährung wurde mit Hilfe gaschromatographischer Methoden von G.Henkelmann, Botanisches Institut, München durchgeführt.

Vorbehandlung: Auf unterschiedlichen S/N-Quellen angezogene Kulturen wurden in 0.1 M Phosphatpuffer, pH 8.0 aufgeschlossen. Das hierbei gewonnene Algenpellet wurde mit Chloroform/Methanol extrahiert und nach Umesterung der Fettsäuren mit Bortrifluorid-Methanol in Form der Fettsäuremethylester der weiteren Analyse im Gaschromatographen zugeführt (87).

2.5.4 Aminosäureanalyse

Die Bestimmung der löslichen Aminosäuren in Chlorella fusca bei Variation der S/N-Ernährung wurde mit Hilfe eines Aminosäureanalysators im Labor von Prof. Dr.Fiedler, München durchgeführt.

Vorbehandlung:

Nach Zellaufschluß in 0.1 M Phosphatpuffer, pH 7.5 wurde der Rohextrakt 1:1 mit 10 %iger TCA versetzt und 1 Stunde im Eis inkubiert. Der gebildete Niederschlag wurde in der gekühlten Ultrazentrifuge bei 48 000 g abgetrennt, der nun klare Überstand lyophilisiert und bis zur weiteren Verwendung im Gefrierschrank bei -16 °C aufbewahrt.

2.6: Enzymteste

2.6.1 Desulfonase

Das von Willetts und Cain (207) beschriebene Enzym katalysiert die Hydrolyse aromatischer Sulfonsäuren und wurde auf die Verhältnisse bei Alkylsulfonsäuren übertragen.

Durchführung (nach 207)

In 1 ml Endvolumen befanden sich 100 μmol Tris/HCl, pH 7.5; 1 μmol Äthansulfonat bzw. Taurin und Enzym/Rohextrakt. Zusätzlich wurden Testansätze mit Zusätzen von NADH (400 nmol), ATP (5 μmol - MgCl_2 10 μmol) und DTE (10 μmol) inkubiert. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37 °C wurde hierbei gebildetes Sulfit über den Sulfitoxidase/NADH-Test von Boehringer bestimmt (2.4.4).

2.6.2 α -Hydroxylase

Das von Thyse und Wanders (192) entdeckte Enzym katalysiert die Desulfonierung von n-Alkylsulfonsäuren in Bakterien unter Bildung von Aldehyden und Bisulfit. Das Enzym benötigt für seine Aktivität O_2 und NADH. Diese NADH-Abnahme konnte über die Extinktionsabnahme bei 340 nm am Photometer direkt verfolgt werden und diente als Meßprinzip.

Durchführung (nach 192)

In 1 ml Endvolumen befanden sich 100 μmol Tris/HCl, pH 8.0; 1 μmol Äthansulfonat bzw. Taurin; 0.1 μmol NADH und Enzym/Rohextrakt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von NADH in die Küvette gestartet und 5 Minuten lang über den Extinktionsverlauf bei 340 nm am Photometer verfolgt.

Zusätzlich wurde versucht, nach Beendigung der Reaktion die Anwesenheit von Sulfit (2.4.4), Sulfat (2.4.5) oder von Aldehydgruppen (2.4.7) nachzuweisen.

2.6.3 Thiosulfatreduktase (E.C. 2.2.8.1)

Dieses Enzym katalysiert in Gegenwart von DTE die Spaltung von Thiosulfat zu Sulfit und H_2S , welches als Methylenblau bestimmt werden kann (2.4.6)

Durchführung (nach 13,68)

Der Testansatz enthielt in 1 ml Endvolumen: 100 μmol Tris/HCl, pH 9.5; 40 μmol DTE; 200 nmol $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ und Enzym/Rohextrakt.

Nach Zugabe von Thiosulfat wurden die Reagenzgläser mit Gummikappen verschlossen

und für 30 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt durch Zugabe der Reagenzien zur Methylenblaubestimmung (2.4.6). Nach weiteren 20 Minuten (im Dunkeln) wurde das gebildete Methylenblau bei 670 nm gegen einen Nullwert ohne Enzym/bzw. ohne Substrat bestimmt. (Der molare Extinktionskoeffizient der Reaktion beträgt $15 \times 10^6 \text{ cm}^2 \times \text{mol}^{-1}$).

2.6.4 Cysteinsynthase (E.C. 4.2.99.8)

Die Cysteinsynthase katalysiert in vitro die Reaktion von O-Acetyl-L-Serin und H_2S zu Cystein, das mit Hilfe des sauren Ninhydrinreagenz (Gaitonde), nachgewiesen werden kann (2.4.7).

Durchführung (nach 113,152)

In 1 ml Endvolumen befanden sich 100 μmol Tris/HCl, pH 7.5; 2 μmol DTE; 5 μmol H_2S ; 5 μmol O-Acetyl-L-Serin und Enzym/Rohextrakt.

Nach dem Start mit O-Acetyl-L-Serin wurden die Reagenzgläser mit Gummikappen verschlossen und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Das gebildete Cystein wurde durch Zugabe von 1 ml Gaitonde-Reagenz gegen einen Nullwert ohne Enzym bei 546 nm gemessen. Der Cysteingehalt konnte anschließend durch den mitgeführten Eichwert von 100 nmol L-Cystein bestimmt werden.

Traten zu hohe Extinktionen auf, die über dem Eichbereich lagen, so wurde das Enzym mit 20 mM Tris/HCl, pH 7.5 vorverdünnt.

2.6.5 Cysteindesulphydrasen (E.C. 4.4.1.1)

Cysteindesulphydrasen katalysieren den Abbau von Cystein unter Freisetzung von H_2S , das als Methylenblau bestimmt werden kann (2.4.6). Aus Chlorella fusca sind D- und L-Cysteindesulphydrasen bekannt (172).

2.6.5.1 L-Cysteindesulphydrase

Durchführung (nach 172)

Der Testansatz enthielt in einem Endvolumen von 1 ml: 100 μmol Tris freie Base; 2 μmol DTE; 800 nmol L-Cystein und Enzym/Rohextrakt.

Nach Start der Reaktion mit L-Cystein wurden die Reagenzgläser mit Gummikappen verschlossen und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Der gebildete Schwefelwasserstoff wurde 20 Minuten nach Zugabe der Methylenblaureagenzien bei 670 nm gegen einen Nullwert ohne Enzym bestimmt. (Der molare Extinktionskoeffizient beträgt $28.5 \times 10^6 \text{ cm}^2 \times \text{mol}^{-1}$).

2.6.5.2 D-Cysteindesulphydrase

Durchführung: Die D-Cysteindesulphydrase wurde in analoger Weise ermittelt. Der Testansatz enthielt in einem Endvolumen von 1 ml 100 μmol Tris/HCl, pH 9.0; 2 μmol DTE; 800 nmol D-Cystein und Enzym/Rohextrakt.

2.6.6 Arylsulfatase (E.C. 3.1.6.1)

Arylsulfatasen katalysieren die Abspaltung Sulfats aus aromatischen Sulfateestern. Zur Erfassung dieser Reaktion erwiesen sich v.a. Phenylsulfate als geeignete Substrate (z.B. p-Nitrophenylsulfat), da sie nach enzymatischer Desulfatierung veränderte Absorptionsraten im alkalischen Milieu aufwiesen.

Durchführung (nach 59)

In 200 μl Endvolumen befanden sich: 50 μmol Tris/HCl, pH 8.0; 2 μmol p-Nitrophenylsulfat und Enzym/Rohextrakt.

Nach zweistündiger Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 0.5 N NaOH (800 μl) gestoppt. Das gebildete p-Nitrophenol wurde bei 410 nm gegen einen Nullwert ohne Enzym/bzw. ohne Substrat gemessen. Der p-Nitrophenolgehalt wurde anschließend über den mitgeführten Eichwert von 10 nmol p-Nitrophenol bestimmt.

2.6.7 Sulfataktivierung

Die sogenannte "Sulfataktivierung" setzt sich zusammen aus der Aktivität von ATP-Sulfonylase und APS-Sulfotransferase und wird über die Reduktionsrate von ^{35}S -Sulfat zu ^{35}S -Sulfit in Gegenwart von DTE bestimmt (siehe 2.8.2 - Bildung säurelabiler Radioaktivität und Nachweis vermittelt Conway-Technik).

Durchführung (nach 171)

Der Testansatz enthielt in 1 ml Endvolumen: 100 μmol Tris/HCl, pH 8.0; 10 μmol MgCl_2 ; 10 μmol DTE; 5 μmol ATP; 2 μmol $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ (1000 cpm/nmol) und Rohextrakt. Nach Zugabe ^{35}S -Sulfats wurden die Reagenzgläser mit Gummikappen verschlossen, mit Stickstoff begast und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 100 μmol Na_2SO_3 als Carrier (frischzubereitet) wurde das gebildete ^{35}S -Sulfit im Conway-Schälchen bestimmt: ^{35}S - SO_2 wurde durch 1 ml 1 N HCl ausgetrieben, in 1 ml 1 M Triäthanolamin gesammelt und nach 4 Stunden aliquotweise (200 μl) im Szintillationszähler ausgemessen (2.8.2). Die absoluten Werte an ^{35}S -Sulfit konnten über die spezifische Aktivität des ^{35}S -Sulfatstandards bestimmt werden.

2.6.8 Glutaminsynthetase (E.C. 6.3.1.2)

Die Glutaminsynthetase wurde über den Transferase-Test nach (62) bestimmt. In diesem Testverfahren reagiert Glutamin mit Hydroxylamin zu γ -Glutamylhydroxamat, dessen Enolform spezifisch mit Eisen-III-Ionen angefärbt werden kann.

Durchführung (nach 62)

In 1 ml Endvolumen befanden sich: 1 mmol Tris freie Base; 140 μ mol L-Glutamin; 9 μ mol MnCl_2 ; 35 μ mol Hydroxylamin; 1.5 μ mol ATP; 35 μ mol $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ und Enzym/Rohextrakt.

Nach Start der Reaktion mit Arsenat wurden die Reagenzgläser für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt durch Zugabe von 1 ml 0.1 M FeCl_3 in 0.2 N HCl/0.25 M Trichloressigsäure und gleichzeitig angefärbt. Der gebildete Farbkomplex wurde bei 500 nm gegen einen Nullwert ohne Enzym bestimmt.

(Der molare Extinktionskoeffizient beträgt $0.8 \times 10^6 \text{ cm}^2 \times \text{mol}^{-1}$).

2.6.9 Nitratreduktase (E.C. 1.6.6.2)

Die Nitratreduktase katalysiert die Reduktion Nitrats zu Nitrit, das mit Hilfe spezifischer Färbereagenzien bestimmt werden kann (s.u.)

Durchführung (nach 194)

In 0.5 ml Endvolumen befanden sich: 100 μ mol $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer, pH 8.0; 1 μ mol KNO_3 ; 0.075 μ mol NADH und Enzym/Rohextrakt.

Nach Zugabe des Rohextraktes wurden die Testansätze für 15 Minuten bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt durch Zugabe je 1 ml der Färbelösungen (Sulfanilsäure bzw. NED) und 45 Minuten später bei 538 nm gegen den Farbmix photometrisch bestimmt. Der Nitratgehalt konnte über den mitgeführten Eichwert von 10 nmol Nitrit berechnet werden.

Färbelösungen

a) Sulfanilsäure-Reagenz: 1 g Sulfanilsäure in 100 ml verd.HCl gelöst
(HCl: 75 ml Wasser und 25 ml $\text{HCl}_{\text{konz.}}$)

b) NED-Reagenz: 20 mg N-(1-naphthyl)äthylendiamin-hydrochlorid in 100 ml H_2O

Die Färbelösungen wurden in braunen Flaschen, lichtgeschützt bei Raumtemperatur aufbewahrt und zur Bestimmung des Nitritgehaltes in dieser Reihenfolge zugegeben (je 1 ml Lösung a + b).

2.7 Aufnahmeteste

2.7.1 Versuchsbedingungen bei Grün-und Blaualgen

Die Algenkulturen wurden abweichend zu 2.1.2 in 10-25 ml Portionen abgeerntet und nach 2-maligem Waschen in S-freiem Medium in der Tischzentrifuge scharf abzentrifugiert (in Reagenzgläsern).

Die Algenpellets wurden in 2 ml des jeweiligen S-freien Mediums aufgenommen, quantitativ in WARBURG-Gefäße überspült und mit ÄSS, Taurin oder Sulfat bis zu einer Endkonzentration von 0.3 mM und einer spezifischen Radioaktivität von 65 000 Bq/nmol (ungefähr 1000 counts/nmol) versetzt.

Sollte die Einwirkung von Hemmstoffen, Cofaktoren/Strukturanaloga untersucht werden, so wurden diese 3-5 Minuten vor Zugabe der Schwefelquellen direkt in die WARBURG-Gefäße einpipettiert (Vorinkubation der Algen).

Die Versuchsansätze wurden im WARBURG-Apparat für 5, 15, 30 oder 60 Minuten bei 27 °C, 4500 Lux und geöffneten Hähnen inkubiert. Der WARBURG-Apparat diente also in diesem Fall zur Einstellung definierter Versuchsbedingungen und nicht wie üblich zur Messung von gebildeten/verbrauchten Gasvolumina.

Am Ende der Inkubationszeit wurden die Algen mit S-freiem Medium sehr schnell aus den WARBURG-Gefäßen ausgespült, mehrmals mit diesem Medium gewaschen und mit Rotiszint 22 (einem Flüssigszintillator, speziell zur Messung weicher β -Strahler) im Verhältnis 10:1 versetzt. Die aufgenommene Radioaktivität wurde anschließend im Szintillationszähler bestimmt (2.7.3).

2.7.2 Versuchsbedingungen bei Lemna minor

Lemna minor-Kulturen wurden wie in 2.1.2. angegeben abgeerntet. Jeweils 50-60 der gut gewaschenen Blättchen wurden in den Aufnahmetest eingesetzt. Das Gesamtvolumen im WARBURG-Gefäß betrug 3 ml und die Endkonzentration der Schwefelquelle lag bei 0.4 mM bzw. 130 000 Bq/nmol.

Nach 30-60 Minuten Inkubation im WARBURG-Apparat bei 27 °C und 4500 Lux wurden die Lemna-Blättchen in einem Sieb unter fließendem Wasser gründlich von ^{35}S - bzw. ^3H -haltigem Inkubationsmedium gereinigt. Anschließend wurden die Blättchen mit wenig Wasser in einer Reibschale zerrieben und in die Szintillationsgefäße überführt. Nach Rotiszintzugabe wurden die Proben im Szintillationszähler ausgezählt und auf absolute/spezifische Aufnahmezeiten umgerechnet (2.7.3).

2.7.3 Bestimmung der aufgenommenen Radioaktivität

^{35}S -enthaltende Proben wurden nach Zugabe von Rotiszint 22 (10:1) im ^{14}C -Kanal eines Flüssigkeitsszintillationszählers gemessen. Als Meßdauer wurden 2 Minuten (oder 800 000 Impulse) vorgegeben und die Zählausbeute über die vorab bestimmte Quenchkurve geräteintern berechnet.

^3H -Proben wurden nach derselben Methode im ^3H -Kanal für 2 Minuten gezählt und ohne vorab bestimmte Quenchkurve umgerechnet.

Die absoluten Aufnahmewerte konnten über die spezifische Aktivität des jeweils mitgeführten Standards bestimmt werden.

Sie wurden anschließend bezüglich der unspezifischen Adsorptionsrate an der Algenzellwand korrigiert. Dieser "Nullwert" wurde mit Hilfe vornab getöteter Algen bestimmt und abgezogen.

Die spezifischen Aufnahmeraten der untersuchten Organismen ergaben sich aus den absoluten Aufnahmedaten in nmol bezogen auf Zellzahl/Probe und Zeit (bzw. bei Lemna minor bezogen auf Blättchen/Probe und Zeit.

2.8 Fraktionierter Zellaufschluß

2.8.1 Allgemeiner Verlaufsplan

Der fraktionierte Zellaufschluß sollte eine grobe Bilanzierung der markierten Zellverbindungen nach Inkubation mit ^{35}S -bzw. ^3H -markierter Äthansulfonsäure, Taurin, Sulfat ermöglichen.

Grün- und Blaualgen wurden wie in 2.7.1 beschrieben für eine Stunde im WARBURG-Apparat inkubiert und im Anschluß daran mehrmals mit S-freiem Medium gewaschen. Das gewonnene Pellet wurde im Reagenzglas mit 1 ml 80 %igem Äthanol / 0.01 N Essigsäure und 1 μmol des jeweiligen Carriers versetzt (Na_2SO_4 , Äthansulfonat, Taurin, Cystein, Methionin, Glutathion, Äthanolamin, Phosphatidyläthanolamin) und 5 Minuten bei 80 °C im Wasserbad erhitzt. Nach diesem Zellaufschluß, der gleichzeitig auch einen Großteil der markierten Zellbestandteile extrahierte, wurde in der Tischzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand dekantiert.

Die Extraktion mit 80 %igem Äthanol/0.01 N Essigsäure wurde zweimal wiederholt und die erhaltenen Überstände vereinigt. Danach wurde das Pellet zweimal mit Chloroform/Methanol (2:1) fünf Minuten bei Zimmertemperatur extrahiert, um die in Lipiden festgelegte Radioaktivität quantitativ zu eluieren.

Anschließend wurde das Pellet noch 2 x mit deionisiertem Wasser gewaschen, da sich v.a. Sulfat nur schwer in 80 %igem Athanol/Essigsäure-Gemisch löst. Alle Überstände wurden vereinigt, das Pellet "Proteine" in wenig Wasser aufgenommen und ausgezählt.

Die vereinigten Überstände wurden mit 3 ml Chloroform unterschichtet und gut ausgeschüttelt. Nach der Phasentrennung wurde die wässrige Oberphase mit der Pasteurpipette abgezogen und die Lipidphase noch 2 x mit je 1 ml Wasser versetzt und ausgeschüttelt. Kurze Zentrifugationen nach der Phasentrennung erleichterten die Absaugung der farblosen Oberphase von der grüngefärbten Lipidphase. Wasser- und Lipidphasen wurden im Preßluftstrom eingengt, Aliquots davon ausgezählt und der Rest dünnschichtchromatographisch/dünnschichtelektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.5.1-2.5.2), identifiziert und nach sorgfältiger Elution im Szintillationscounter ausgezählt.

2.8.2 Nachweis flüchtiger Verbindungen mit Hilfe der Conway-Technik

Zellaufschluß im Conway-Schälchen mit anschließender Identifikation flüchtiger markierter Verbindungen diente insbesondere dem Nachweis von Mercaptanen, von Sulfid, Sulfid oder Aminen (38).

a) Bestimmung von Mercaptanen

2 ml 0.01 N HCl im Außenraum diente zum Zellaufschluß/Austreiben des Mercaptans, das über Nacht an 1 ml CuCl (1 g/10 ml Wasser) adsorbiert wurde. Als Carrier diente 100 µmol Äthanthiol. Am nächsten Tag wurden 200 µl der CuCl-Lösung, gut aufgewirbelt, im Szintillationszähler gegen einen Nullwert ohne Algen bestimmt.

b) Bestimmung von Sulfid/Sulfid

Zum Austreiben dieser säurelabilen S-Verbindungen diente 1 ml 1 M HCl. Nach Zugabe von 100 µmol Carrier wurden freigesetztes SO₂ bzw. H₂S über Nacht in 1 ml 1 M Triäthanolamin konzentriert und am nächsten Morgen ausgezählt.

c) Sonderfall: Bestimmung von Sulfid

In analoger Weise zu b) wurde auch Sulfid allein, nach Freisetzung mit HCl und spezifischer Adsorption an Zinkacetat, bestimmt.

d) Bestimmung flüchtiger Amine

Zum Austreiben flüchtiger Amine bei gleichzeitigem Zellaufschluß dienten 2 ml 1 M NaOH. Nach Zugabe von 100 µmol Äthanolamin als Carrier wurden die flüchtigen Amine über Nacht in 1 ml 1 N HCl getrappt und ausgezählt.

C. E r g e b n i s s e

3. Wachstum photosynthetischer Organismen auf Sulfonsäuren als einziger Schwefelquelle

Der biologische Abbau natürlicher und industrieller Sulfonsäuren wurde bisher v.a. anhand heterotropher Organismen untersucht.

Es schien daher interessant aufzuzeigen, inwieweit auch **photosynthetisch aktive Organismen** die Fähigkeit zum Wachstum auf Sulfonsäuren ("Sulfonatverwertung") besitzen und diese alternative Schwefelquelle assimilieren.

Ziel der Untersuchungen war es, einen kurzen Überblick über die Verbreitung der Sulfonatverwertung bei photosynthetischen Organismen zu erhalten, und zwar

- 1- bezüglich der Variationsbreite an verwertbaren Sulfonsäuren (3.1)
- 2- bezüglich der Häufigkeit ihres Auftretens innerhalb der wichtigsten phylogenetischen Stämme (3.2).

Mit Hilfe dieser Informationen sollte ferner ein Einblick in die Bedeutung der Sulfonsäuren als alternative Schwefelquelle im aquatischen System und die Vorteile ihrer Verwertung gewonnen werden.

3.1 Verwertung ausgewählter Sulfonsäuren als Schwefelquelle durch die Grünalge Chlorella fusca 211-8b

3.1.1 Wachstum auf verschiedenen Alkyl- und Arylsulfonsäuren

Chlorella fusca wurde auf zahlreichen Sulfonsäuren als einziger Schwefelquelle im Medium kultiviert (2.1.1), wobei diese Verbindungen in 0.3 mM Konzentration den üblichen Sulfatgehalt des SL-1 Mediums ersetzten. Am 5.Tag wurde abgeerntet und die Algen bezüglich ihres Chlorophyllgehaltes untersucht (Tab.2).

Tab.2: Wachstum der Alge *Chlorella fusca* auf ausgewählten Sulfonsäuren

Schwefelquelle		mg Chlorophyll Kultur
Sulfatkontrolle		6.25
S-Mangel-Kontrolle		0.04
<u>Aliphatische Sulfonsäuren</u>		
Methansulfonsäure	$\text{H}_3\text{C}-\text{SO}_3\text{H}$	2.6
Äthansulfonsäure	$\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{H}$	6.8
2-Hydroxyäthansulfonsäure	$\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{H}$	6.9
Sulfoessigsäure	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{H}$	7.5
Sulfopropionsäure	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{H}$	8.4
<u>S-Substituenten</u>		
2-Mercaptoäthansulfonsäure	$\text{SH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{H}$	5.9
1,2-Äthandisulfonsäure	$\text{HSO}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{H}$	1.2
<u>N-Substituenten</u>		
Sulfaminsäure	$\text{H}_2\text{N}-\text{SO}_3\text{H}$	0.15
Aminomethansulfonsäure	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{H}$	kein Wachstum
Taurin	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{H}$	7.15
3-Amino-1-propansulfonsäure	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{H}$	6.2
<u>Derivate von Aminosäuren</u>		
L-Cysteinsäure		6.9
D,L-Homocysteinsäure		7.4
<u>Aromatische Sulfonsäuren</u>		
Benzolsulfonsäure		0.2
p-Phenolsulfonsäure		1.6
p-Toluolsulfonsäure		0.4
Sulfanilsäure		0.2
<u>Sulfonsäurehaltige Detergentien</u>		
LAS		1.7
α -Talgfettsäure- methylestersulfonat		3.4

Die neutralisierten und sulfatfreien Sulfonsäuren wurden zumeist mitautoklaviert und ersetzt in 0.3 mM Konzentration das übliche Sulfat des SL-1 Mediums (2.1.1). Die Kulturen wurden nach 5 Tagen Wachstum geerntet (2.1.2) und wie in 2.4.1 beschrieben auf Chlorophyllgehalt/Kultur untersucht.

Nach diesen Ergebnissen (Tab.2) kann Chlorella fusca 211-8b auf zahlreichen Sulfonsäuren natürlicher und industrieller Herkunft als einzige Schwefelquelle im Medium wachsen.

Vor allem **aliphatische Sulfonsäuren** unterstützten das Algenwachstum ähnlich gut wie die sonst übliche S-Quelle Sulfat (bestimmt über Chlorophyllgehalt/Kultur). Neben Alkansulfonsäuren wurden Sulfonate mit den verschiedensten funktionellen Gruppen im Molekül (z.B. Hydroxyl-, Sulfhydryl-, Amino- oder Carboxylgruppe) ausgezeichnet metabolisiert. Eine Ausnahme stellten die beiden Sulfonsäuren Sulfaminsäure und Aminomethansulfonsäure dar, die nur geringes/bzw. gar kein Wachstum erlaubten (Aminomethansulfonsäure wirkte selbst in Gegenwart von Sulfat wachstumshemmend).

Aromatische Sulfonsäuren wurden zumeist sehr schlecht verwertet, nur p-Phenol-sulfonsäure zeigte gewisses Wachstum. Auch Detergentien auf Sulfonsäurebasis, z.B. LAS (lineares Alkylbenzolsulfonat) und α -Talgfettsäuremethylestersulfonat vermochten teilweise als Schwefelquelle herangezogen werden.

Insgesamt gesehen, zeigte dieser Wachstumsversuch die **große Variabilität an verwertbaren Sulfonsäuren** auf. Chlorella fusca 211-8b wuchs ferner auf allen getesteten C_1 - C_8 n-Alkan-1-sulfonsäuren, am besten jedoch auf der C_2 -Verbindung, der Äthansulfonsäure (Abb.2).

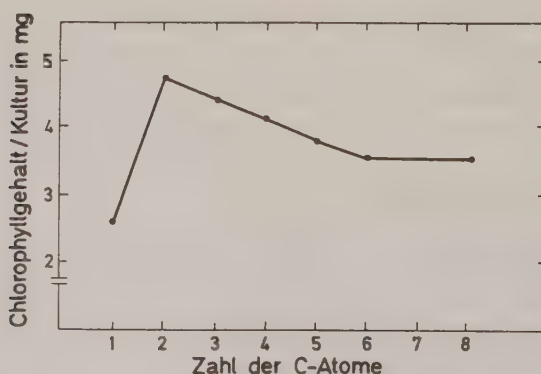


Abb.2: Wachstum auf C_1 - C_8 n-Alkan-1-sulfonsäuren

Versuchsbedingungen siehe Tab.2

Aus diesem Grund wurde die Äthansulfonsäure (ÄSS) in Form ihres Na-Salzes $\text{H}_5\text{C}_2\text{SO}_3^-\text{Na}^+$ für die folgenden Untersuchungen über Aufnahme und Metabolisierung aliphatischer Sulfonsäuren eingesetzt. Ein Teil dieser Versuche wurde später mit einer zweiten Sulfonsäure (2-Aminoäthansulfonsäure = Taurin) wiederholt.

3.1.2 Vergleich des Wachstums auf Äthansulfonsäure und Sulfat

Um das gute Wachstum auf Äthansulfonsäure (dunkelgrüne, sehr dichte Kultur) gezielt dokumentieren zu können, wurde *Chlorella fusca* parallel auf Sulfat, Äthansulfonat (ÄSS) und schwefelfreiem Medium kultiviert und 8 Tage lang auf folgende Wachstumsparameter untersucht:

Optische Dichte bei 680 nm, Zellzahl, Frischgewicht

Chlorophyllgehalt/Kultur und pro Zelle, Gesamtproteingehalt

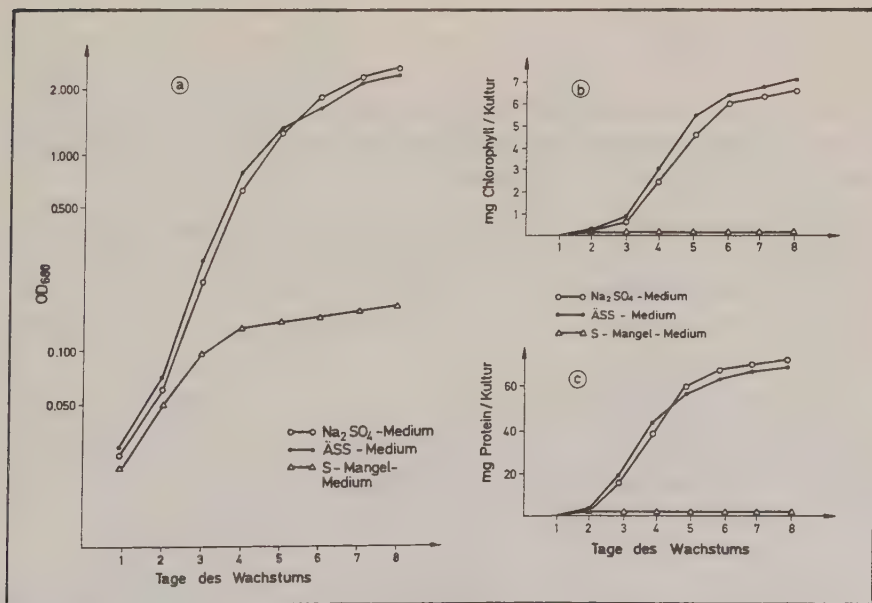


Abb.2: Vergleich dreier Wachstumsparameter bei Anzucht auf Sulfat, Äthansulfonat und S-Mangelmedium

Chlorella fusca 211-8b wurde 8 Tage lang auf 0,3 mM Äthansulfonat, 0,3 mM Sulfat bzw. auf S-freiem Medium kultiviert (2.1.1). Allen Kulturen wurden täglich Proben entnommen und bezüglich optischen Dichte bei 680 nm (2a), Chlorophyllgehalt (2b) und Proteingehalt (2c) untersucht: 2.4.1; 2.4.2. Die OD_{680} wurde photometrisch bei 1 cm Lichtweg bestimmt.

Tab.3: Vergleich ausgewählter Wachstumsparameter nach 5 Tagen Wachstum auf Äthansulfonsäure als einziger Schwefelquelle

Schwefelquelle	Zellzahl pro Kultur	Frischgewicht pro Zelle (g)	Chlorophyllgehalt (mg)	Chlorophyllgehalt einer Zelle/ Trockengewicht	Protein-gehalt (mg)
Na_2SO_4	26.3×10^8	8.6×10^{-10}	6.25	2.2 %	63.5
$\text{C}_2\text{H}_5\text{SO}_3^- \text{Na}^+$	30.4×10^8	7.95×10^{-10}	6.8	2.2 %	58.7
keine	1.6×10^8	4.1×10^{-10}	0.04	0.3 %	1.2

Chlorella fusca 211-8b wurde 5 Tage lang auf 0.3 mM Äthansulfonat, 0.3 mM Sulfat bzw. auf S-freiem Medium kultiviert (2.1.1) und danach bezüglich folgender Wachstumsparameter untersucht: Zellzahl (2.1.3), Frischgewicht (2.1.3), Chlorophyllgehalt/Kultur (2.4.1) und Proteingehalt/Kultur (2.4.2).

Abb.2 zeigt den Verlauf der drei Wachstumsparameter OD_{680} (Abb.2a), Chlorophyllgehalt (Abb.2b) und Gesamtproteingehalt (Abb.2c) während 8 Tagen Wachstum auf Medien unterschiedlicher S-Versorgung.

Aus Abb.2 wird ersichtlich, daß der Wachstumsverlauf auf Äthansulfonat und Sulfat bezogen auf diese Parameter gleich gut war, während ohne S-Quelle im Medium nur äußerst geringes Algenwachstum festgestellt werden konnte: Geringe OD_{680} auf der logarithmischen Skala, Gesamtchlorophyllgehalt 0.04 mg, Gesamtproteingehalt 1 mg.

Auch andere Wachstumsdaten (Zellzahl, Frischgewicht, Chlorophyllgehalt/Zelle) zeugten vom guten Wachstum der Alge auf Äthansulfonsäure und unterschieden sich praktisch nicht von den Daten der Sulfatkulturen - deutlich aber von denen einer Schwefelmangelkultur (Tab.3).

Wichtig: Bei Wachstum auf Äthansulfonsäure als einziger Schwefelquelle zeigte *Chlorella fusca* keine äußeren Schwefelmangelsymptome .

3.2 Wachstum photosynthetischer Organismen auf Äthansulfonsäure und Taurin als einziger Schwefelquelle

Zahlreiche Cyanobakterien, Algen und höhere Pflanzen wurden auf Äthansulfonat als einziger Schwefelquelle im Medium gezogen und bezüglich des dort gezeigten Wachstums (Chlorophyllgehalt/Kultur) mit der Sulfatkultur verglichen.

Die Ergebnisse sind in Tab.4 aufgelistet.

Gutes Wachstum auf Äthansulfonsäure wurde vor allem innerhalb der Gruppe der Blau- und Grünalgen festgestellt: 11 von 15 Grünalgen und 3 von 10 getesteten Blaualgen konnten diese Verbindung ebenso gut wie Sulfat als Schwefelquelle für das Wachstum nutzen.

Allerdings besaßen nicht alle Vertreter der Blau- und Grünalgen diese Fähigkeit; fakultative Sulfonatverwertung variierte sogar innerhalb einer Familie/Gattung, z.B. zwischen Chlorella fusca und Chlorella vulgaris oder zwischen Scenedesmus communis und Scenedesmus armatus (Tab.4).

Kein Wachstum auf Äthansulfonsäure zeigten die Vertreter der Euglenophyceen, Bacillariophyceen, Rhodophyceen und der höheren Pflanzen.

(Einschränkend muß jedoch erwähnt werden, daß die Arten dieser Gruppe aufgrund ihrer Verfügbarkeit im Institut/Algensammlung Göttingen ausgewählt wurden und nicht aufgrund besonderer physiologischer Eigenschaften. Tab.4 muß daher nicht notwendigerweise die tatsächliche Bandbreite biochemischer Fähigkeiten innerhalb dieser Gruppe widerspiegeln und einzelnen Mitgliedern kann es durchaus möglich sein, Äthansulfonsäure als Schwefelquelle zu nutzen).

Um diese Variationsbreite genauer zu untersuchen, wurde die obige Versuchsreihe mit einer 2.Sulfonsäure (Taurin = 2-Aminoäthansulfonsäure) partiell wiederholt. Die Wachstumsergebnisse auf Taurin sind in Tab.5 zusammengestellt und zeigen eine deutliche Übereinstimmung zur Äthansulfonat-Verwertung (Tab.4):

- Alle Organismen, die Äthansulfonsäure verwerten können, können auch Taurin als Schwefelquelle nutzen
- Alle Organismen, die Äthansulfonsäure nicht verwerten können, wachsen auch nicht auf Taurin

Die Grünalge Chlorella K stellte dabei eine gewisse Ausnahme dar: Sie verwertete die beiden Sulfonsäuren in unterschiedlichem Ausmaß. Während sie Taurin uneingeschränkt als S-Quelle nutzen konnte, erreichte sie bei Äthansulfonsäure maximal 38 % des Chlorophyllgehaltes einer Sulfatkultur (konnte aber ÄSS nach Erhöhung des Phosphatgehaltes im Medium auf das 5-fache ebenfalls vollständig nutzen).

3.3 Zusammenfassung: Wachstum photosynthetischer Organismen auf
 Sulfonsäuren als alternative Schwefelquelle

Photosynthetisch aktive Organismen verschiedener phylogenetischer Abstammung wurden auf Sulfonsäuren als einziger Schwefelquelle im Medium kultiviert und bezüglich des dort gezeigten Wachstums überprüft.

Aus dieser Versuchsanordnung ergaben sich folgende Ergebnisse:

- 1- Zahlreiche **Grün- und Blaualgen** konnten auf Äthansulfonsäure oder Taurin als einziger Schwefelquelle im Kulturmedium wachsen ("Sulfonatverwerter").
- 2- Die Fähigkeit, Sulfonsäuren als vollwertige S-Quelle nutzen zu können (Chlorophyllgehalt vergleichbar einer Sulfatkultur) trat bezogen auf Äthansulfonsäure und Taurin immer gekoppelt auf.
- 3- Am Beispiel Chlorella fusca zeigte sich die **große Variationsbreite** an verwertbaren Sulfonsäuren, v.a. aus der aliphatischen Reihe, die das Algenwachstum zumeist ausgezeichnet unterstützten konnten.

4. Sulfonsäure-Aufnahme in photosynthetische Organismen

Wie in 3.2 gezeigt, ist die Fähigkeit zur Verwertung aliphatischer Sulfonsäuren nicht in allen untersuchten Organismen vorhanden.

Unterschiede traten sogar zwischen nah verwandten Arten auf - möglicherweise hervorgerufen durch fehlende **Aufnahmesysteme** und/oder fehlende **Abbauege** für die aufgenommenen Sulfonsäuren. Zur Klärung dieses Problems wurden zunächst Aufnahmestudien mit ^{35}S -markierten Sulfonsäuren durchgeführt und eine Auswahl von fakultativen Sulfonatverwertern in den Test eingesetzt.

Ziel der Untersuchungen war es, Sulfonsäure-Aufnahmeprozesse in photosynthetisch aktiven Organismen nachzuweisen, mit der Fähigkeit zum Wachstum auf Sulfonsäuren zu korrelieren und Bedingungen für die Ausbildung des Sulfonat-Aufnahmesystems aufzuzeigen.

4.1 Sulfonsäure-Aufnahme versus Sulfonatverwertung

Als Versuchsobjekte dienten mehrere photosynthetische Organismen, die nach 3.2 unterschiedliches Wachstum auf Sulfonsäuren gezeigt hatten: Die Cyanobakterien Anabaena variabilis und Synechococcus, die Grünalge Chlamydomonas reinhardtii, zwei Chlorella- und zwei Scenedesmus-Stämme, sowie Lemna minor als Vertreter der höheren Pflanzen.

4.1.1 Äthansulfonsäure-Aufnahme in photosynthetische Organismen

Die Versuchsobjekte wurden auf Sulfat, Äthansulfonat bzw. auf S-freiem Medium kultiviert und auf ÄSS-Aufnahme überprüft. Parallel zur Messung der ÄSS-Aufnahme erfolgte die Bestimmung der Sulfataufnahme mit Hilfe ^{35}S -markierten Sulfats (2.7).

Tab.6: ÄS- und Sulfataufnahme in ausgewählte photosynthetische Organismen

Organismus	Wachstum auf ÄSS (C ₂ H ₅ SO ₃ ⁻)	Sulfatkulturen		ÄSS-Kulturen		S-Mangel-Kulturen	
		Sulfat- aufnahme	ÄSS- aufnahme	Sulfat- aufnahme	ÄSS- aufnahme	Sulfat- aufnahme	ÄSS- aufnahme
<u>Cyanobakteria</u>							
- Anabaena variabilis	+	62	0	686	86	466	184
- Synechococcus 6301	-	4.5	0	6.6	0	8	0
<u>Chlorophyceae</u>							
- Chlorella fusca 211-8b	+	610	0	2796	380	4146	1224
- Chlorella vulgaris 211-1e	-	80	0	1680	0	2256	0
- Chlamydomonas reinhardtii	-	118	0	2926	0	4098	0
- Scenedesmus armatus 276-4a	-	1322	0	5877	0	2845	0
- Scenedesmus communis 276-4b	+	1133	0	8408	583	6722	5950
<u>Höhere Pflanzen</u>							
- Lemna minor	-	0.94	0	11.7	0	7	0

Die Organismen wurden auf 0.3 mM Äthansulfonat, 0.3 mM Sulfat bzw. S-Mangel-Medium kultiviert (2.2.1) und nach 5 Tagen Wachstum (*Lemna minor*: 20 Tagen) abgeerntet (2.7). Anschließend wurden die Aufnahmeraten für 0.3 mM ³⁵S-markierte Äthansulfonsäure bzw. Sulfat im WARBURG-Apparat bestimmt (27 °C, 4500 Lux). Die Aufnahmeraten sind angegeben in nmol x Zelle⁻¹ x h⁻¹ x 10⁻⁹ (*Lemna minor*: nmol x Blättchen⁻¹ x h⁻¹ x 10). Alle Daten wurden bezüglich der nichtspezifischen Adsorptionsrate an die Zellwand korrigiert (2.7.3).

Die Ergebnisse der ÄSS/Sulfataufnahme bei unterschiedlicher S-Ernährung sind in Tab.6 zusammengestellt. Aus diesen Daten geht klar hervor:

- Sulfatkulturen zeigen **niemals** ÄSS-Aufnahme
- Kulturen, die Äthansulfonsäure als S-Quelle nicht nutzen können, zeigen bei keiner vorgegebenen Testbedingung ÄSS-Aufnahme
- **ÄSS-Aufnahme** besitzen all diejenigen Kulturen/Organismen, die diese Verbindung als Schwefelquelle nutzen können, und zwar
 - .- in ÄSS-haltigem Medium
 - .- in S-Mangelmedium
 - .- nicht jedoch in sulfathaltigem Medium
- **ÄSS-Aufnahme ist immer mit erhöhter Sulfataufnahme korreliert.**
Aber: Zunahme der Sulfataufnahmekapazität wurde bei allen getesteten ÄSS- und S-Mangelkulturen gefunden, unabhängig von gleichzeitig stattfindender ÄSS-Aufnahme bzw. Wachstum auf Äthansulfonsäure

Aus diesen Aufnahmedaten ergeben sich folgende Schlußfolgerungen, die richtungsweisend für den weiteren Gang der Untersuchungen waren:

1. Für Organismen, die nicht auf Äthansulfonsäure als S-Quelle wachsen können, gilt (unabhängig von der potentiellen Gegenwart sulfonatabbauender Enzyme in der Zelle):
"Nichtverwertung = Nichtaufnahme der Sulfonsäuren"
2. Algen, die auf Äthansulfonsäure als S-Quelle wachsen können, entwickeln ein spezifisches Aufnahmesystem für diese Sulfonsäure (siehe auch Kap.5 - Charakterisierung des ÄSS-Aufnahmesystems in Chlorella fusca 211-8b).
3. Die Ausbildung dieses Aufnahmesystems erfolgt unabhängig von der Anwesenheit seines Substrates, anscheinend hervorgerufen durch Sulfat/Schwefel-Mangelbedingungen im Kulturmedium.

Die gewonnenen Ergebnisse/Schlußfolgerungen wurden nun mit Hilfe einer zweiten Sulfonsäure ("Taurin") überprüft.

4.1.2 Taurinaufnahme in photosynthetische Organismen

Analog zu 4.1.1 wurden die Versuchsobjekte auf Taurin, Sulfat bzw. auf S-freiem Medium kultiviert und bezüglich Taurin/ÄSS/Sulfataufnahme untersucht.

Die Ergebnisse sind in Tab.7 aufgelistet (wichtige Erweiterung zu Tabelle 6).

Tab. 7: Taurin/ÄSS/Sulfataufnahme in ausgewählte photosynthetische Organismen

Organismus	Wachstum auf		Sulfatkulturen		ÄSS-Kulturen		Taurinkulturen		S-Mangel-Kulturen					
	Taurin	ÄSS	Sulfat	ÄSS	Sulfat	ÄSS	Taurin	Sulfat	ÄSS	Taurin				
<u>Cyanobakteria</u> - <i>Anabaena variabilis</i> - <i>Synechococcus</i> 6301	+	+	62	0	0	686	86	191	646	78	38	466	184	144
	-	-	4,5	0	0	6,6	0	0	5,9	0	0	8	0	0
<u>Chlorophyceae</u> - <i>Chlorella fusca</i> 211-8b - <i>Chlorella vulgaris</i> 211-1e - <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> - <i>Scenedesmus armatus</i> 276-4a - <i>Scenedesmus communis</i> 276-4b	+	+	610	0	0	2796	380	510	2456	352	496	4146	1224	980
	-	-	80	0	0	1680	0	0	2040	0	0	2256	0	0
	-	-	118	0	0	2926	0	0	3008	0	0	4098	0	0
	-	-	1322	0	0	5877	0	0	4683	0	0	2845	0	0
	+	+	1133	0	0	8408	583	1570	6288	1174	499	6722	5980	11770
<u>Höhere Pflanzen</u> - <i>Lemna minor</i>	-	-	0,94	0	2,73 (siehe 6,3)	11,7	0	n. b.	Wachstumshemmung		7	0	0	0,62

Die Organismen wurden auf 0,3 mM Taurin, Äthansulfonat, Sulfat bzw. S-Mangel-Medium kultiviert (2.2.1) und danach auf Taurin/ÄSS/Sulfat-Aufnahme untersucht (2.7). Weitere Versuchsbedingungen siehe Tab. 6. Die Aufnahmearten sind angegeben in $\text{nmol} \times \text{Zelle}^{-1} \times \text{h}^{-1} \times 10^{-9}$ (*Lemna minor*: $\text{nmol} \times \text{Blättchen}^{-1} \times \text{h}^{-1} \times 10$). Alle Daten wurden bezüglich der nichtspezifischen Adsorptionsrate an die Zellwand korrigiert (2.7.3).

Blau-und Grünalgen

Die in Tab.7 aufgeführten Transportraten für Taurin, ÄSS und Sulfat entsprachen ziemlich genau den in 4.1.1 erzielten Ergebnissen/Schlußfolgerungen. Bestätigt wurde auch die Aufteilung der getesteten Organismen in 2 Gruppen, abhängig davon, ob Wachstum auf Sulfonsäuren erfolgte oder nicht.

a) Algen mit gutem Wachstum auf Sulfonsäuren

Alle Organismen, die auf Taurin (bzw. ÄSS) als einziger S-Quelle wuchsen, nahmen diese Verbindung unter bestimmten Kulturbedingungen auf: In S-freiem Medium/Taurinmedium, nicht dagegen in Sulfatmedium.

Wichtig: ÄSS-und Taurinaufnahme traten jeweils gekoppelt auf

b) Algen mit fehlendem Wachstum auf Sulfonsäuren

Organismen, die Taurin (ÄSS) als S-Quelle nicht verwerten konnten, wiesen bei keiner vorgegebenen Testbedingung Taurinaufnahme auf.

Lemna minor

Abweichend zu den Verhältnissen bei Blau-und Grünalgen nahmen bei Lemna minor auch die entsprechenden Sulfatkulturen Taurin auf. Allerdings zeigte die Pflanze in Gegenwart von 0.4 mM Taurin, längerfristig gesehen, Wachstumshemmung (Tab.5). Weitere Unterschiede der Taurinaufnahme (Substratspezifität) werden in einem späteren Kapitel beschrieben (6.3).

4.2 Sulfonsäure-Aufnahme versus Ernährungsbedingungen

Für Algen gilt: Sulfonatverwertung ist mit der Fähigkeit zur Sulfonataufnahme korrelierbar (ÄSS,Taurin). Dies konnte am Beispiel der Sulfonatkulturen gezeigt werden. Andererseits besaßen Sulfatkulturen **niemals** ÄSS/Taurinaufnahme, selbst wenn die betreffenden Organismen sehr gut auf Sulfonsäuren wachsen konnten.

Es schien daher interessant zu überprüfen, bei welchen "**Ernährungsbedingungen**" Sulfonataufnahme in Algen nachzuweisen ist. Dies geschah mit Hilfe der Grünalge Chlorella fusca, die stellvertretend für andere fakultative Sulfonatverwerter unter verschiedenen Bedingungen der S,N-und Fe-Versorgung im Medium kultiviert wurde (siehe Tab.8).

Parallel zur Messung der Sulfonataufnahme (ÄSS/Taurin) erfolgte die Bestimmung der Aufnahmeraten für ³⁵S-markiertes Sulfat.

4.2.1 ÄSS-Aufnahme bei unterschiedlichem Ernährungstatus

Die differierende Kultivation der Grünalge Chlorella fusca 211-8b ließ sich in drei Gruppen einteilen:

1. **Unterversorgung** an den Elementen S,N und Fe
2. Anzucht auf verschiedenen **Schwefelquellen**, die das Wachstum der Alge gut unterstützen konnten (Chlorophyllgehalt/Kultur)
3. Gleichzeitige 0.3 mM Sulfatzugabe zu allen Kulturen (unabhängig von der jeweils angebotenen Schwefelquelle)

Tab.8 zeigt einen kurzen Überblick der ÄSS/Sulfat-Aufnahme in Chlorella fusca bei den einzelnen Ernährungsbedingungen. Aus diesen Daten geht eindeutig hervor:

- zu 1- Nur Schwefel-Mangelkulturen wiesen ÄSS-Aufnahme auf, nicht jedoch N-bzw. Fe-Mangelkulturen
- zu 2- Mit Ausnahme der Sulfatkulturen besaßen alle anderen (auf alternativen Schwefelquellen kultivierten) Versuchsansätze ÄSS-Aufnahme
- zu 3- Mit Sulfat versetzte Kulturen zeigten keine ÄSS-Aufnahme

Tab.8: ÄSS- und Sulfataufnahme bei unterschiedlichen Ernährungsbedingungen

Ernährungsstatus	ÄSS-Aufnahme	Sulfataufnahme	<u>Chlorophyllgehalt</u> Kultur
Sulfat	0	610	6.26 mg/Kultur
S-Mangel	1224	4146	0.04 "
N-Mangel (N/30)	0	55	1.60 "
Fe-Mangel	0	175	2.92 "
Äthansulfonsäure	380	2796	6.80 "
Taurin	510	2545	7.15 "
Cystein	440	2930	7.90 "
Methionin	410	3015	6.10 "
Äthansulfonsäure + Sulfat	0	580	6.72 "
Taurin + Sulfat	0	630	7.20 "
Cystein + Sulfat	0	630	8.05 "
Methionin + Sulfat	0	605	6.05 "

Chlorella fusca 211-8b wurde wie angegeben für 5 Tage kultiviert (N/30 7 Tage) und auf ÄSS/Sulfataufnahme untersucht (2.7). Die Aufnahmearten sind angegeben in $\text{nmol} \times \text{Zelle}^{-1} \times \text{h}^{-1} \times 10^{-9}$ und bezüglich der nicht-spezifischen Adsorptionsrate an die Zellwand korrigiert (2.7.3). Weitere Versuchsbedingungen siehe Tab.6.

Daraus lassen sich folgende Schlußfolgerungen ziehen:

- Die Ausbildung der ÄSS-Aufnahme in Chlorella fusca 211-8b erfolgte nur in Abwesenheit von Sulfationen im Medium (bei S-Mangelbedingungen oder bei Angebot einer nicht-sulfathaltigen Schwefelquelle).
- Die ÄSS-Aufnahme stellte damit eine spezifische Antwort der Alge auf Sulfat/Schwefel-Mangelbedingungen dar und wurde unabhängig von der Anwesenheit seines Substrates im Medium ausgebildet.

Ähnliche Untersuchungsergebnisse wurden auch für die Sulfataufnahme gefunden. Nach Tab.8 verhielt sich die Größe der Sulfataufnahmekapazität gleichlaufend zur ÄSS-Aufnahme: Nur bei Abwesenheit aller Sulfationen im Medium erhöhte sich die Sulfataufnahmerate um den Faktor 4-5 über das geringe Aufnahmeniveau in sulfathaltigen Medien. Im Gegensatz dazu, zeigten N- bzw. Fe-Mangelkulturen weder ÄSS-Aufnahme noch erhöhte Sulfataufnahme. Die Sulfataufnahmerate war in beiden Fällen sogar deutlich unter das Niveau sulfatgezogener Algen abgesenkt.

4.2.2 Taurinaufnahme bei unterschiedlicher Schwefelversorgung

Chlorella fusca wurde analog zu 4.2.1 auf zahlreichen Schwefelquellen mit und ohne Sulfatzusatz kultiviert und nach 5 Tagen Wachstum auf Taurin(ÄSS)-Aufnahme überprüft (Tab.9).

Tab.9: Taurinaufnahme bei unterschiedlicher Sulfat/Schwefel-Versorgung

Ernährungsstatus	Taurinaufnahme	ÄSS-Aufnahme	Sulfataufnahme
Sulfat	-	-	+
S-Mangel	++	++	++++
Äthansulfonsäure	+	+	++
Taurin	+	+	++
Cystein	+	+	++
Methionin	+	+	++
Äthansulfonsäure + Sulfat	-	-	+
Taurin + Sulfat	-	-	+
Cystein + Sulfat	-	-	+
Methionin + Sulfat	-	-	+

Chlorella fusca 211-8b wurde wie angegeben für 5 Tage kultiviert und danach auf Taurin/ÄSS/Sulfat-Aufnahme untersucht (2.7). Weitere Versuchsbedingungen siehe Tab.6.

Tab.9 zeigt die Ergebnisse dieses Versuchs in schematischer Form und vergleicht das Aufnahmeverhalten gegenüber Taurin, ÄSS und Sulfat.

Daraus wird ersichtlich: Taurinaufnahme fand sich parallel zur ÄSS-Aufnahme in allen Kulturen, die auf Medien ohne 0.3 mM Sulfatzusatz angezogen worden waren (unabhängig von der jeweils angebotenen/fehlenden S-Quelle), wohingegen Kulturen mit ausreichender Sulfatversorgung keinen Sulfonattransport aufwiesen.

Wichtig: ÄSS- und Sulfataufnahme traten unter Sulfat/Schwefel-Mangelbedingungen immer gekoppelt auf (und gehorchten damit den gleichen Prinzipien zur Ausbildung ihrer Aufnahmesysteme).

4.3 Ausbildung der Sulfonsäure-Aufnahme in *Chlorella fusca* in Abwesenheit von Sulfat

Wie in 4.2 gezeigt, konnte *Chlorella fusca* 211-8b beide Sulfonsäuren nur nach Kultivierung auf sulfatfreiem Medium aufnehmen, während sulfatversetzte Ansätze keinen Sulfonsäuretransport aufwiesen. Dieses Phänomen wurde als "spezifische Antwort der Alge auf herrschende Sulfat/Schwefel-Mangelbedingungen" gedeutet.

Unbekannt war jedoch, wie schnell sulfatversetzte Algen auf die Anwesenheit dieser Mangelbedingung reagieren können und nach Umsetzung auf sulfatfreies Medium mit der Ausbildung von ÄSS- und Taurinaufnahme beginnen.

4.3.1 Ausbildung des Äthansulfonat-Aufnahmesystems

Sulfatgewachsene Algen wurden geerntet, mehrmals mit S-freiem Medium gewaschen und zu gleichen Teilen auf je 2 Pirsonflaschen mit Äthansulfonat, Sulfat bzw. S-Mangelmedium aufgeteilt. Eine der beiden Algenflaschen enthielt zusätzlich Cycloheximid (einen Hemmstoff der Proteinbiosynthese) in der Konzentration von 5×10^{-5} M.

Die Aufnahmezeiten für ^{35}S -ÄSS und ^{35}S -markiertes Sulfat wurden bis zu 8 Stunden nach Umsetzung kontinuierlich gemessen (Abb.3/4).

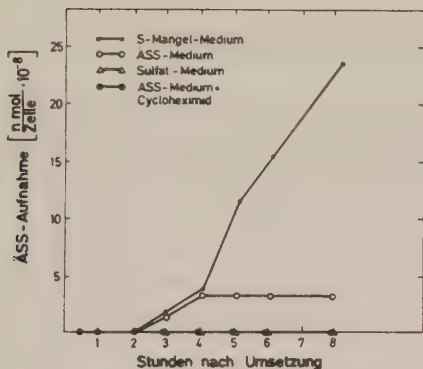


Abb.3: Entwicklung der ÄSS-Aufnahme unter Mangelbedingungen

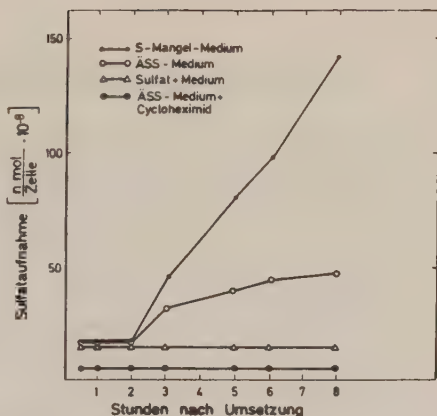


Abb.4: Entwicklung der Sulfataufnahme unter Mangelbedingungen

Abb.3: Sulfatgewachsene Algen wurden abgeerntet, mehrmals mit S-freiem Medium gewaschen und danach auf je zwei Pirsonflaschen mit ÄSS, Sulfat- bzw. S-Mangel-Medium verteilt (Symbole siehe Abb.). Eine der beiden Flaschen wurde mit Cycloheximid (5×10^{-5} M) versetzt; sie ist in Abb.3 durch ein Beispiel vertreten. Nach definierten Zeiträumen wurden Proben entnommen und bezüglich ÄSS-Aufnahme analysiert (2.7). Definierte Versuchsbedingungen im WARBURG-Apparat: 27 °C, 4500 Lux, Endkonzentration von 0.3 mM ÄSS. Die Aufnahmeraten sind angegeben in $\text{nmol} \times 30 \text{ Minuten}^{-1} \times \text{Zelle}^{-1} \times 10^{-9}$.

Abb.4: Die Bestimmung der Sulfataufnahme nach Umsetzung einer Sulfatkultur wurde wie in Abb.3 beschrieben durchgeführt. Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.3

Abb.3 zeigt die zeitliche Analyse der ÄSS-Aufnahme in Chlorella fusca 211-8b: Während der ersten 2-2.5 Stunden nach Umsetzung fand wie in der sulfathaltigen Ausgangskultur keine Sulfonataufnahme statt. Nach dieser "lag-Phase" begann die ÄSS-Aufnahme gleichzeitig in der ÄSS- und S-Mangelkultur. Während aber die Sulfonatkultur nach 4 Stunden bereits ihre Maximalaufnahmegeschwindigkeit erreicht hatte, stiegen die Aufnahmeraten der S-Mangelkultur beständig an. Im Gegensatz dazu, zeigten nach 8 Stunden weder die Sulfatkontrolle noch die drei mit Cycloheximid versetzten Kulturen ÄSS-Aufnahme.

Die kinetische Analyse der Sulfataufnahme in Abb.4 verhielt sich gleichermaßen wie die eben beschriebene ÄSS-Aufnahme: Die gleiche lag-Phase von 2-2.5 Stunden, die gleichen überschießenden Aufnahmeraten der S-Mangelkultur im Vergleich zur ÄSS-Kultur und keine Veränderung der Aufnahmegeschwindigkeiten für Sulfat in Sulfat- und Cycloheximidkulturen.

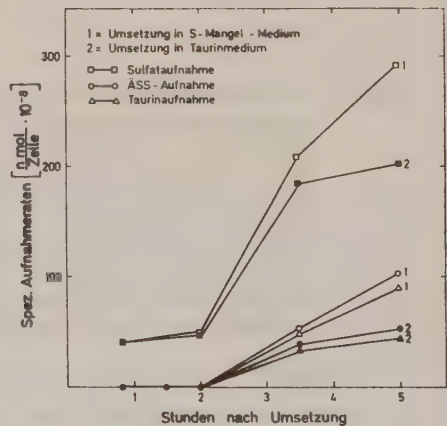
4.3.2 Ausbildung des Taurin-Aufnahmesystems bei Sulfatmangel

Die in 4.3.1 gewonnenen Versuchsergebnisse wurden mit Hilfe Taurins überprüft. Vorbehandlung wie in 4.3.1: Sulfatgewachsene Algen wurden geerntet, mehrmals mit S-freiem Medium gewaschen und zu gleichen Teilen auf je 2 Pirsonflaschen mit Taurin-, Sulfat- und S-Mangelmedium aufgeteilt. Eine der beiden Flaschen enthielt zusätzlich Cycloheximid in der Konzentration von 5×10^{-5} M.

Die Aufnahmeraten für ^{35}S -Taurin, ÄSS und Sulfat wurden bis zu 5 Stunden nach Umsetzung kontinuierlich gemessen (Abb.5: Darstellung erfolgte exemplarisch für das Taurin- und S-Mangelmedium).

Abb.5: Entwicklung von Taurin/ÄSS/Sulfat-Aufnahme unter Mangelbedingungen

Versuchsbedingungen und Versuchsdurchführung siehe Abb.3



Die kinetische Analyse der Taurin/ÄSS/Sulfat-Aufnahme in Chlorella fusca 211-8b nach Umsetzung auf sulfatfreies Medium verläuft in sich homolog und steht in Übereinstimmung zu Abb.3/4:

- In der lag-Phase von 2 Stunden verhielten sich alle Aufnahmeraten wie in der sulfathaltigen Ausgangskultur
- Nach dieser lag-Phase begannen in Taurin/S-Mangelmedium gleichzeitig Taurin/ÄSS-Aufnahme und erhöhte Sulfataufnahme
- Nach 5 Stunden ergab die Analyse überschießende Aufnahmeraten der S-Mangelkultur im Vergleich zur Taurinkultur
- Sulfatkulturen/mit Cycloheximid versetzte Kulturen zeigten keine Veränderung des Aufnahmeverhaltens

Die Ausbildung der Taurinaufnahme in Chlorella fusca stand damit in zeitlicher Übereinstimmung zur ÄSS-Aufnahme (erfolgte nach den gleichen Prinzipien).

4.4 Zurückbildung der Sulfonsäure-Aufnahme nach Sulfatzugabe

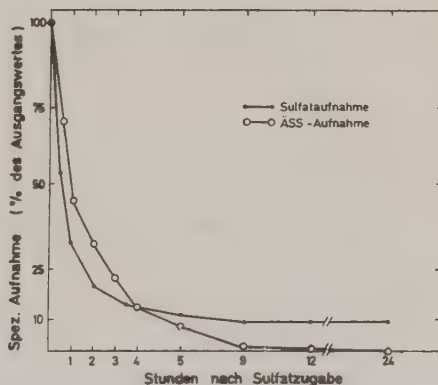
Wie bisher gezeigt, besaßen Sulfatkulturen von Chlorella fusca 211-8b nicht die Fähigkeit zur Sulfonsäure-Aufnahme. Die Ausbildung dieser Eigenschaft erfolgte erst nach Umsetzung der Algen auf sulfatfreies Medium.

Zu Klären blieb das Aufnahmeverhalten einer ÄSS/Taurin-Kultur nach Sulfatzugabe ins Medium (Rückbildung der Aufnahmeprobe), bzw. die Reaktion dieser Kulturen auf die Gegenwart von Sulfat.

4.4.1 Rückbildung des Äthansulfonat-Aufnahmesystems

Chlorella fusca 211-8b wurde 5 Tage auf Äthansulfonat kultiviert und zu einem definierten Zeitpunkt mit 0.3 mM Sulfat versetzt. Als Kontrollversuch diente eine zweite Pirsonflasche mit 5×10^{-5} M Cycloheximid. Die ÄSS-/Sulfataufnahme beider Kulturen wurde bis zu 24 Stunden nach Sulfatzugabe gemessen (Abb.6).

Abb.6: Rückgang der ÄSS-bzw. Sulfataufnahme in Chlorella fusca 211-8b nach Sulfatzugabe



Chlorella fusca 211-8b wurde auf 0.3 mM Äthansulfonat kultiviert und nach 5 Tagen Wachstum mit 0.3 mM Na_2SO_4 versetzt. Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und bezüglich ÄSS-bzw. Sulfataufnahme untersucht. Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.3.

Abb.6 zeigt den Rückgang der ÄSS-/Sulfataufnahme nach Zugabe von 0.3 mM Na_2SO_4 : Sulfatzusatz bewirkte eine sofortige Abnahme beider Transportgeschwindigkeiten. Die ÄSS-Aufnahme sank dabei innerhalb einer Stunde auf 45 % und in 9 Stunden auf 2 % des Ausgangswertes. 24 Stunden nach Sulfatzugabe war wie in original Sulfatkulturen keine ÄSS-Aufnahme mehr meßbar.

Auch das Sulfataufnahmesystem in $\ddot{A}$ SS-Kulturen besaß eine Halbwertszeit von weniger als einer Stunde. Es sank nach Sulfatzugabe innerhalb dieser Zeit auf 33 % der Aktivität und erreichte 9 Stunden später die neue Gleichgewichtslage. Cycloheximid hatte keinen Einfluß auf den Rückgang von $\ddot{A}$ SS-oder Sulfataufnahme in $\ddot{A}$ SS-Kulturen (nicht eingezeichnet), da die Kontrollkultur gleiche Abnahmegeschwindigkeiten beider Aufnahmesysteme aufwies.

4.4.2 Rückbildung des Taurin-Aufnahmesystems nach Sulfatzugabe

Analog zu 4.4.1 wurde Chlorella fusca 211-8b fünf Tage auf Taurin kultiviert und anschließend mit 0.3 mM Sulfat versetzt. Als Kontrolle diente eine zweite Pirsonflasche, die ohne Sulfatzusatz parallel zur Versuchskultur gezogen wurde. Die Taurinaufnahme beider Kulturen wurde bis zu 12 Stunden nach Sulfatzugabe bestimmt (Abb.7).

Auffallend die zeitliche Übereinstimmung des Rückgangs von $\ddot{A}$ SS/Taurinaufnahme nach Sulfatzugabe (Halbwertszeiten, Vgl. Abb.6/7).

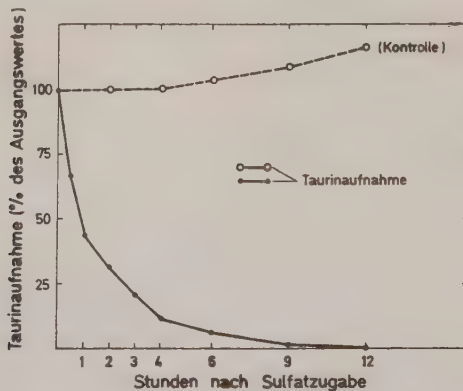


Abb.7: Rückgang der Taurinaufnahme nach Sulfatzugabe

Chlorella fusca 211-8b wurde auf 0.3 mM Taurin kultiviert und nach 5 Tagen Wachstum mit 0.3 mM Na_2SO_4 versetzt. Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und bezüglich Taurin-Aufnahme untersucht (2.7). Als Kontrolle diente eine zweite, tauringewachsene Kultur ohne Sulfatzusatz. Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.3.

4.5 Zusammenfassung: Sulfonsäure-Aufnahme in photosynthetische Organismen

Die Fähigkeit zur Aufnahme der Sulfonsäuren Taurin/Äthansulfonsäure ist weder in allen untersuchten photosynthetischen Organismen (siehe Sulfonatverwertung) noch bei allen Ernährungsbedingungen vorhanden.

Grundsätzlich gilt:

- 1- Organismen, die auf Sulfonsäuren als einziger Schwefelquelle **nicht** wachsen können, fehlt die Fähigkeit zur Aufnahme von Sulfonsäuren unter allen Testbedingungen.
- 2- Organismen, die auf Sulfonsäuren als einziger S-Quelle wachsen können ("**Sulfonatverwerter**") besitzen unter ganz bestimmten Kulturbedingungen die Fähigkeit zur **Sulfonat-Aufnahme**
 - .- in Abwesenheit von Sulfationen
 - .- unter Schwefel-Mangelbedingungen
- 3- Sulfonsäureaufnahme ist **immer** mit erhöhter Sulfataufnahme korreliert. Die Ausbildung beider Transportkapazitäten gehorcht den gleichen Gesetzmäßigkeiten ("**Sulfat/Schwefel-Mangelbedingungen**")
- 4- Aber: Erhöhte Sulfataufnahme muß nicht mit der Fähigkeit zur Sulfonsäure-Aufnahme korrelieren. Gestiegene Sulfataufnahmeraten wurden bei allen Organismen unter S-Mangelbedingungen gefunden.

Mit Hilfe Chlorella fuscas 211-8b wurden die Bedingungen zur Ausbildung eines Sulfonsäure-Aufnahmesystems (ÄSS,Taurin) in Algen untersucht:

- .- Die Ausbildung des Aufnahmesystems erfolgte unabhängig von der Anwesenheit seines Substrates im Medium (keine Substratinduktion)
- .- Die Ausbildung dieses Aufnahmesystems erfolgte nur bei Abwesenheit von Sulfationen im Medium, als spezifische Antwort auf herrschende Sulfat/Schwefel-Mangelbedingungen.
- .- Sulfonataufnahme entwickelte sich ca. 2,5 Stunden nach Umsetzung auf sulfatfreies Medium ("lag-Phase") und bildete sich sofort nach Sulfatzugabe wieder zurück
- .- Das Sulfonsäure-Aufnahmesystem besaß eine Halbwertszeit von weniger als einer Stunde
- .- ÄSS-und Taurinaufnahme verhielten sich analog und traten bei allen Bedingungen/Zeitpunkten gekoppelt auf

5. Charakterisierung der ÄSS-Aufnahme in Chlorella fusca

Wie in Kap.4 gezeigt, tritt in Chlorella fusca unter Sulfat/S-Mangelbedingungen ÄSS-Aufnahme immer parallel zu stark erhöhter Sulfataufnahme auf.

Ziel der Untersuchungen war es daher, die Diversität beider Aufnahmesysteme in der Alge aufzuzeigen und die ÄSS-Aufnahme als eigenständiges System - ungleich einer Unspezifität des Sulfataufnahmesystems - zu charakterisieren.

Zu diesem Zweck wurden parallele Testansätze betreffs Kinetik, Systemspezifität, Inhibitoren, optimalen Parametern u.v.m... durchgeführt und gegenübergestellt. Als Rahmenbedingungen wurden die physiologischen Aufzuchtbedingungen der Alge gewählt, um unkontrollierbare Nebeneffekte möglichst ausschließen zu können.

Die Ergebnisse erlaubten zweierlei zu dokumentieren:

- 1- Die eingehende Charakterisierung des nicht-konstitutiven Aufnahmesystems für Äthansulfonsäure (ÄSS) in ÄSS-Algen
- 2- Die klare Abgrenzung dieses ÄSS-Aufnahmesystems von dem konstitutiven Sulfataufnahmesystem sulfatgezogener Algen

Im Anhang dieses Kapitels (5.11) schließt sich ferner eine kurze Beschreibung des hochaktiven Sulfataufnahmesystems in ÄSS-Algen an.

5.1 Linearität der ÄSS-und Sulfataufnahme

5.1.1 Zeitabhängigkeit der Aufnahme

Die Aufnahmezeiten für 0.3 mM Äthansulfonsäure und Sulfat, gemessen im WARBURG bei 28 °C und 4500 Lux, waren für mindestens 90 Minuten linear (Abb.9).

Die "Aufnahmegerade" verlief dabei nicht durch den Nullpunkt, da jeweils kleine Mengen an ³⁵S-Material unspezifisch an die Zelloberfläche der Alge adsorbiert wurden (2.7.3: die Adsorption erfolgte gleichermaßen bei toten wie bei lebenden Zellen und mußte daher von den gemessenen Aufnahmezeiten subtrahiert werden).

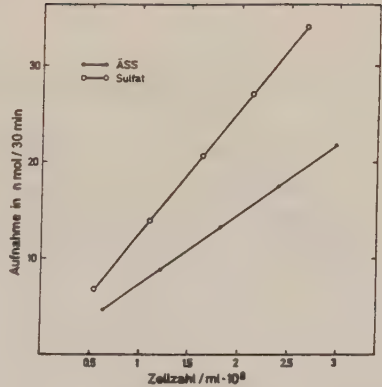
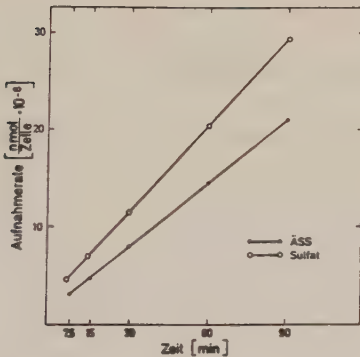


Abb.9: Zeitabhängigkeit der ÄSS/Sulfataufnahme in Chlorella fusca

Abb.10: Abhängigkeit der ÄSS/Sulfataufnahme von der Zellzahl

Abb.9: Chlorella fusca 211-8b wurde 4-5 Tage auf 0.3 mM Äthansulfonat bzw. Sulfat kultiviert (2.1.1). Nach mehrmaligen Waschen mit S-freiem SL-1 Medium wurden die Algen in S-freiem Medium bis zu einer Zelldichte von $1-2 \times 10^8$ Zellen/ml resuspendiert (2.7). Nach Zugabe von ^{35}S -markiertem 0.3 mM ÄSS/Sulfat wurden die WARBURG-Gefäße für die angegebenen Zeiträume inkubiert.

Versuchsbedingungen: 4500 Lux, 28 °C, 0.3 mM Endkonzentration von ÄSS bzw. Sulfat, Zelldichte $1-2 \times 10^8$ Zellen/ml.

Abb.10: Die eingesetzte Zellzahl variierte wie in der Abb. angegeben. Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.9 .

5.1.2 Abhängigkeit der Aufnahmeraten von der Zellzahl

Die Aufnahmeraten für 0.3 mM Äthansulfonat und Sulfat waren direkt proportional zur eingesetzten Zelldichte bis zu maximal 3×10^8 Zellen/ml (Abb.10).

In den folgenden Aufnahmestudien wurden daher durchschnittlich $1-2 \times 10^8$ Zellen/ml einer 4-5 Tage alten Chlorella fusca-Kultur (am Ende der logarithmischen Phase) in den Test eingesetzt.

5.2 Äthansulfonat-Efflux

Die Effluxraten wurden mit Hilfe von ÄSS-Algen gemessen, die in 3 mM ^{35}S -ÄSS für eine Stunde inkubiert waren (WARBURG-Apparat). Anschließend wurden die Algen nach mehrmaligem Waschen mit S-freiem SL-1 Medium in frischen Medium mit unmarkierter Äthansulfonsäure resuspendiert.

Nach weiteren 30 Minuten Inkubation im WARBURG wurden die Zellen abzentrifugiert. Die Bestimmung der Radioaktivität im Überstand ergab nur vernachlässigbare Spuren an freigesetzten radioaktiven Materials, was für einen unidirektionalen ÄSS-Transport in die Alge Chlorella fusca spricht.

5.3 Substratabhängigkeit und Kinetik des ÄSS-Transportes

Die ÄSS-Aufnahmeraten in Chlorella fusca waren abhängig von der Konzentration an Äthansulfonsäure im Medium und zeigten im Bereich von 10^{-6} bis 10^{-2} M ÄSS eine hyperbolische MICHAELIS-MENTEN-Sättigungskinetik (Abb.11).

Die doppelt reziproke Darstellung der Mediumkonzentrationen nach LINEWEAVER-BURK gegen die ÄSS-Aufnahmeraten ergab eine diphasische Aufnahmekurve (Abb.11) mit:

Phase I (1×10^{-6} M bis 6×10^{-5} M) : $K_m = 5.0 \times 10^{-5}$ M

Phase II (6×10^{-5} M bis 1×10^{-2} M) : $K_m = 3.8 \times 10^{-4}$ M

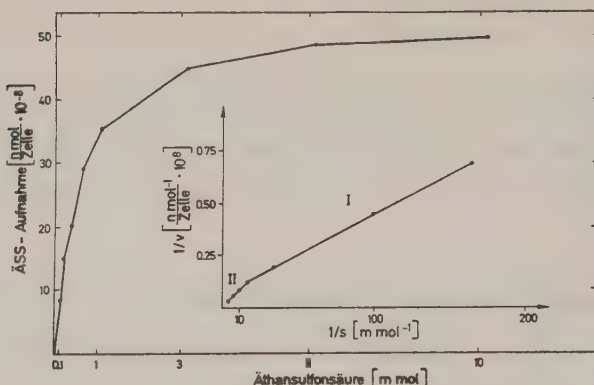
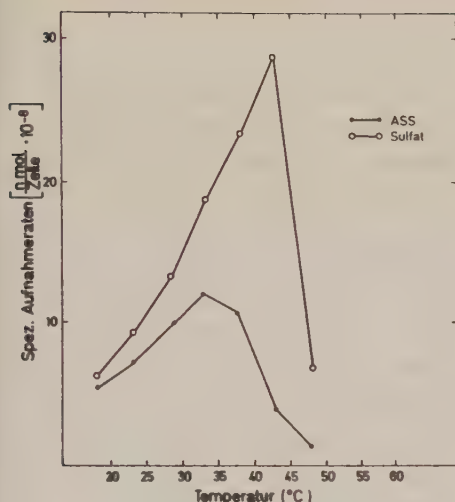


Abb.11: Konzentrationsabhängigkeit der ÄSS-Aufnahme (K_m -Wert) und Darstellung nach LINEWEAVER-BURK

Die Transportraten bei unterschiedlicher ÄSS-Konzentration wurden aus drei Versuchsreihen bestimmt. Die Inkubationsdauer betrug 30 Minuten. Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.9.

5.4 Temperaturabhängigkeit

Die ÄSS-Aufnahme zeigte eine deutliche Temperaturabhängigkeit (Abb.12) und ein Temperaturoptimum bei 33°C . Im Gegensatz dazu erreichte die Sulfataufnahme erst bei 43°C ein scharf ausgeprägtes Transportoptimum. Oberhalb von 55°C wurden beide Systeme irreversibel inaktiviert (Zelltod).



Tab.12: Temperaturabhängigkeit der
ASS- und Sulfataufnahme

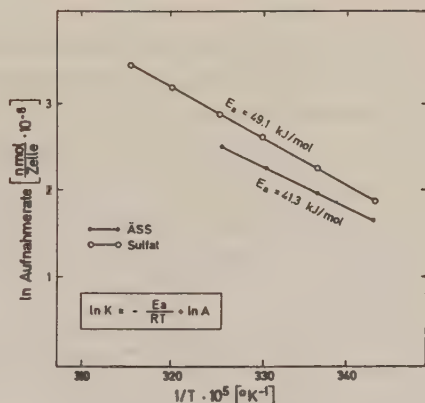


Abb.13: Arrhenius-Diagramm

Abb.12: ASS- und sulfatgewachsene Algen wurden in S-freiem SL-1 Medium aufgenommen, mit ^{35}S -markierter ASS/Sulfat versetzt und ohne Vorinkubation (Temperaturadaptation) in den Aufnahmetest bei der jeweiligen Temperatur eingesetzt. Die Inkubationsdauer betrug 15 Minuten. Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.9.

Abb.13: Graphische Umsetzung der Daten aus Abb.12 (Temperaturabhängigkeit).

Abb.13 zeigt das Arrhenius-Diagramm beider Aufnahmeprozesse (rechts).

Aus der Steigung der Arrhenius-Geraden konnten die Aktivierungsenergien ermittelt werden. Sie betrugen 41,3 kJ/mol (ASS) und 49,1 kJ/mol (Sulfat). Wie zu erwarten, lag damit der Wert für die Aufnahme des monovalenten ASS-Anions in Chlorella fusca unter dem Wert des divalenten Sulfatanions. Zum Vergleich: Die Aktivierungsenergie für die Aufnahme des elektroneutralen Guaninmoleküls in die Alge (35,2 kJ/mol) lag ebenfalls um den entsprechenden Betrag unter den gemessenen Aktivierungsenergien, so daß sich die Einzelwerte harmonisch in das Gesamtbild einfügen (150).

Nach Abb.13 waren ASS- und Sulfataufnahme über den gesamten Temperaturbereich von 18 - 43 °C monophasisch, da der für Membransysteme obligatorische Übergang von Gel- zur flüssig-kristallinen Struktur der Lipide bereits stattgefunden hatte. Diese Übergangstemperatur beträgt in Chlorella fusca 13 °C (150) und Abb.13 zeigt somit nur den oberen Ast der üblichen biphasischen Aufnahmegeraden.

Die Q_{10} -Werte der beiden Aufnahmesysteme lagen zwischen 2.0 und 1.7 (Tab.10). Sie wiesen zusammen mit der Thermolabilität der Aufnahmesysteme jenseits des Temperaturoptimums und der Aktivierungsenergien (s.o.) auf einen enzymähnlichen, carrier-vermittelten Permeationsprozeß der ÄSS-bzw. Sulfataufnahme hin.

Tab.10: Q_{10} -Werte der ÄSS-und Sulfataufnahme in *Chlorella fusca*

Temperatur- bereich	Q_{10} (ÄSS)	Q_{10} (Sulfat)
18-28 °C	1.9	2.0
23-33 °C	1.7	2.0
28-38 °C	-	1.8
33-43 °C	-	1.7

5.5 pH-Abhängigkeit

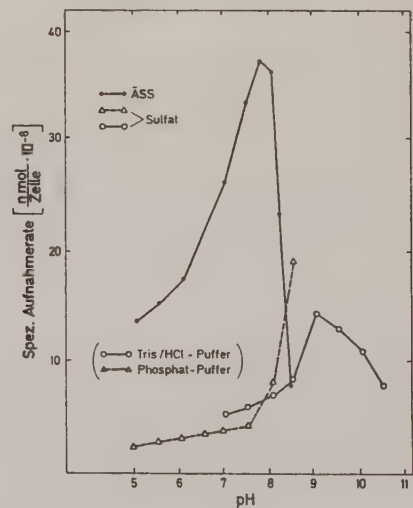
ÄSS-und Sulfataufnahme in *Chlorella fusca* zeigten eine deutliche pH-Abhängigkeit mit unterschiedlichen pH-Optima und Aufnahmeraten (Abb.14).

Abb.14: pH-Abhängigkeit der ÄSS-und Sulfataufnahme

Nach 3-5 Minuten Vorinkubation im jeweiligen 0.01 M Puffersystem wurden die ÄSS- bzw. sulfatgewachsenen Algen wie üblich in den Aufnahmetest eingesetzt. Die Inkubationsdauer betrug 30 Minuten. Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.9.

Puffersystem A: 0.01 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, pH 5.0-8.5

Puffersystem B: 0.01 M Tris/HCl-Puffer, pH 8.0-10.5



In 0.01 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer besaß die ÄSS-Aufnahme ein pH-Optimum bei pH 7.8. Die Sulfataufnahme wies dagegen in diesem Puffersystem (pH 5.0 - 8.5) nur eine kontinuierliche Zunahme der Transportraten auf und zeigte erst ein ausgeprägtes pH-Optimum bei pH 9.0 in 0.01 M Tris/HCl-Puffer, pH 7.0-10.5.

Da beide Verbindungen als Salze starker Säuren über die hier gemessene pH-Spanne vollständig dissoziiert vorlagen, müssen die pH-Effekte über eine Beeinflussung der Aufnahmesysteme diskutiert werden (z.B. über Protonierung/Deprotonierung).

Ein Vergleich der Aufnahmeraten in Abb.14 ergab ferner, daß trotz gegenläufiger Km-Werte (ÄSS 50 μM - Sulfat 12 μM (5.3/5.11) und Transportraten im SL-1 Medium (Tab.6/7) die Sulfataufnahme in beiden Puffersystemen deutlich geringer war als die entsprechende ÄSS-Aufnahme. Daher wurden in einem nachfolgenden Versuch die Einflüsse verschiedener Puffersysteme auf die ÄSS- und Sulfataufnahme ausführlich untersucht (Puffersysteme jeweils 0.01 M und pH 7.5).

Tab.11 zeigt auf, wie unterschiedlich die beiden Aufnahmeprozesse von den gewählten Puffersystemen beeinflusst wurden. Auffallend die starke Förderung der ÄSS-Aufnahme durch Phosphatpuffer (siehe auch Punkt 5.6.2).

Tab.11: Beeinflussung der ÄSS/Sulfataufnahme in Chlorella fusca durch verschiedene Puffersysteme

Puffersysteme (0.01 M, pH 7.5)	ÄSS-Aufnahme (% der Kontrolle)	Sulfataufnahme (% der Kontrolle)
$\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$	510	37
$\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$	505	39
Tris/HCl	175	45
Imidazol/HCl	21	12
Triäthanolamin/ CO_2	4	6

Nach 3-5 Minuten Vorinkubation im jeweiligen Puffersystem (0.01 M; pH 7.5) wurden die Algen wie üblich in den Aufnahmetest eingesetzt. Die Inkubationsdauer betrug 30 Minuten. Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.9.

5.6 Substratspezifität

5.6.1 Strukturanaloga der Äthansulfonsäure

Die Spezifität des ÄSS-Aufnahmesystems in der Alge Chlorella fusca 211-8b wurde durch "Kompetitionsversuche" bestimmt, indem zahlreiche unmarkierte Sulfonsäuren, Monocarbonsäuren und andere monovalente Anionen in 10-facher Konzentration in den Aufnahmetest eingesetzt wurden.

Die Ergebnisse sind in Abb.15 graphisch zusammengestellt.

a) Sulfonsäuren

Alle getesteten n-Alkansulfonsäuren hemmten die ÄSS-Aufnahme, wobei länger-kettige Verbindungen einen stärkeren Hemmeffekt ausübten als die kurzkettigen Homologa. Aufnahmehemmend wirkten auch Sulfonsäuren mit den verschiedensten funktionellen Gruppen im Molekül, so daß anscheinend alle hier getesteten Sulfonsäuren um die Substratbindungsstelle des Transportsystems konkurrierten. Die Erkennung der Sulfonsäuregruppe wurde damit durch benachbarte Hydroxyl-, Amino-, Sulfhydryl-, Carboxyl- oder Benzylgruppen trotz unterschiedlicher Ladung und Raumerfüllung nicht beeinflußt.

b) Monocarbonsäuren

Das "C-Analogon" Propionsäure (bzw. Propionat), bei dem die Sulfonsäuregruppe durch eine Carboxylgruppe ersetzt war, beeinflußte die ÄSS-Aufnahme nicht (ebensowenig Acetat) und setzte damit eine Unterscheidungsfähigkeit der Alge voraus.

c) Anorganische monovalente Anionen

Die Anionen F^- , Cl^- und NO_3^- beeinflussten auch in 10-facher Konzentration die ÄSS-Aufnahme der Alge nicht.

d) Sulfat

Sulfat zeigte keine Hemmung der ÄSS-Aufnahme in Chlorella fusca und lieferte damit nach 5.4 und 5.5 ein weiteres Indiz für die Diversität beider Transportprozesse. ÄSS-Aufnahme über eine Unspezifität des Sulfataufnahmesystems konnte demzufolge ausgeschlossen werden.

In einem zweiten Versuchsteil (Abb.15 unten) wurden analoge Kompetitionsversuche anhand des konstitutiven Sulfataufnahmesystems durchgeführt.

Mit Hilfe dieses Kontrollversuches sollte gewährleistet werden, daß die aktuelle Beeinflussung der ÄSS-Aufnahme durch Sulfonsäuren ein spezifischer Effekt aufgrund Struktur analogie darstellt und kein unspezifischer Hemmeffekt auf die Stoffwechselprozesse allgemein (z.B. über die Beeinflussung der Energieversorgung).

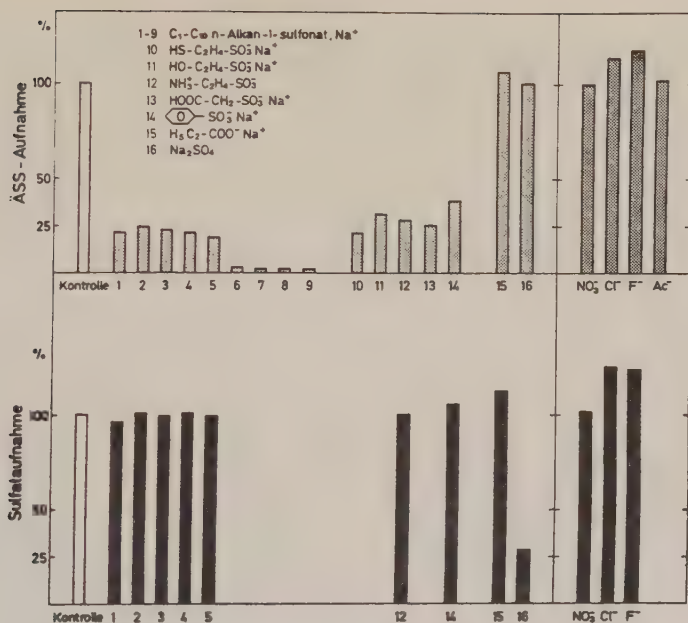


Abb. 15: Substratspezifität der ASS- und Sulfataufnahme

ASS- bzw. sulfatgewachsene Algen wurden 3-5 Minuten in der zu testenden 3 mM Verbindung vorinkubiert. Alle Substanzen lagen neutralisiert und in Form ihrer Na-Salze vor. Die Inkubationsdauer betrug 30 Minuten. Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb. 9.

Nach Abb. 15 beeinflussten keine der getesteten Sulfonsäuren, Monocarbonsäuren oder andere monovalente Anionen die Sulfataufnahme in *Chlorella fusca* negativ. Nur die 10-fache Sulfatkonzentration senkte die Sulfataufnahme durch Isotopenverdünnung auf 15 % ab.

Zusammenfassend wies damit das ASS-Aufnahmesystem in *Chlorella fusca* folgende Substratspezifität auf:

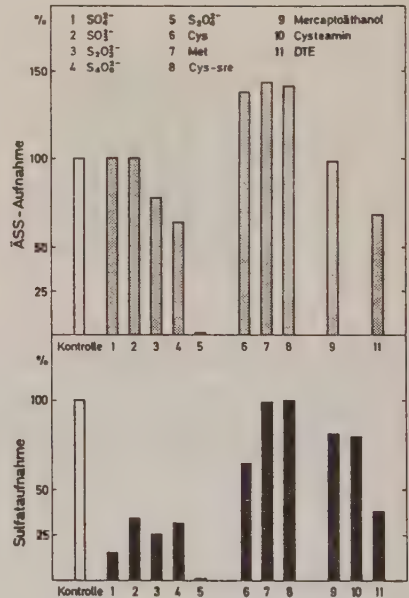
Die Spezifität des Aufnahmesystems war auf die Anwesenheit einer Sulfonsäuregruppe im Molekül beschränkt, zeigte aber innerhalb dieser Gruppe keine Präferenzen. Unterschiedliche funktionelle Gruppen im Molekül wurden toleriert. Diskriminiert wurden dagegen Monocarboxylate und andere monovalente Anionen.

5.6.2 Einfluß anderer Schwefelanionen und Schwefelverbindungen auf die ÄSS-Aufnahme in Chlorella fusca

Durch den Einsatz weiterer Strukturanaloga (Sulfit, Thiosulfat, Dithionit und Tetrathionat) und anderer natürlich vorkommender Schwefelverbindungen (L-Cystein, L-Methionin und L-Cysteinsäure) wurden die Untersuchungen zur Spezifität des ÄSS-Aufnahmesystems in Chlorella fusca fortgesetzt. Die Testansätze wurden in 10-fachen Überschuß der zu testenden Verbindung inkubiert (Abb.16).

Abb.16: Beeinflussung von
ÄSS-und Sulfataufnahme
durch Schwefelanionen und
andere S-Verbindungen

ÄSS-bzw. sulfatgewachsene Algen wurden 3-5 Minuten in der zu testenden unmarkierten 3 mM Verbindung vorinkubiert. Alle Substanzen lagen neutralisiert und in Form ihrer Na-Salze vor. Die Inkubationsdauer betrug 30 Minuten. Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.9.



Nach Abb.16 wurde die ÄSS-Aufnahme teilweise durch die beiden "anorganischen" Sulfonsäureanaloga gehemmt (Thiosulfat, Tetrathionat), nicht jedoch durch andere S-Verbindungen (Sulfat, Sulfit, Cyst(e)in, Methionin). Einen Sonderfall stellte die unspezifische Wirkung von Natriumdithionit dar (ein starkes Reduktionsmittel). Cysteinsäure bewirkte dagegen wie die beiden Aminosäuren L-Cys und L-Met eine gewisse Erhöhung der ÄSS-Aufnahme ("Aminosäure-Effekt", siehe 5.9.3). Dies ist etwas überraschend, da Cysteinsäure demzufolge von Chlorella fusca nicht als "Sulfonsäure" sondern als "Aminosäure" erkannt und aufgenommen wird, obwohl die Alge Cysteinsäure sehr wohl als S-Quelle zum Wachstum heranziehen kann.

Im Gegensatz zu diesen Versuchsergebnissen wies die Sulfataufnahme in Chlorella abweichende Spezifitäten und Einflußnahmen S-haltiger Verbindungen auf (Abb.16, unten). So bewirkten alle Schwefelanionen (Sulfat, Sulfit, Thiosulfat, Tetrathionat) und die Aminosäure L-Cyst(e)in eine deutliche Hemmung der Sulfataufnahme. Auch Mercaptoverbindungen (Mercaptoäthanol, Cysteamin, DTE) wirkten aufnahmehemmend.

5.7 Hell/Dunkel-Effekte

Um den Einfluß von Licht (bzw. Dunkelheit) auf die $\ddot{A}$ SS/Sulfataufnahme zu bestimmen, wurden einzelne WARBURG-Gefäße mit Aluminiumfolie umwickelt und gemeinsam mit beleuchteten Gefäßen inkubiert.

Abb.17 zeigt das unterschiedliche Verhalten der beiden Aufnahmeprozesse gegenüber einem Licht/Dunkel-Wechsel auf: Im Gegensatz zur relativ unveränderten $\ddot{A}$ SS-Aufnahme (rechts), nahm die Sulfataufnahme im Dunkeln um fast 50 % ab. Ein gleichlaufendes Verhalten wiesen die beiden Aufnahmesysteme auch gegenüber 1 mM DCMU-Zugabe auf, einem bekannten Hemmstoff der Photosynthese. Das unterschiedliche Verhalten von $\ddot{A}$ SS/Sulfataufnahme auf Licht/Dunkel-Wechsel lieferte damit ein weiteres Indiz für die Diversität beider Aufnahmesysteme und erlaubte darüber hinaus eine erste Aussage bezüglich Energieversorgung der Aufnahmesysteme (siehe Diskussion).

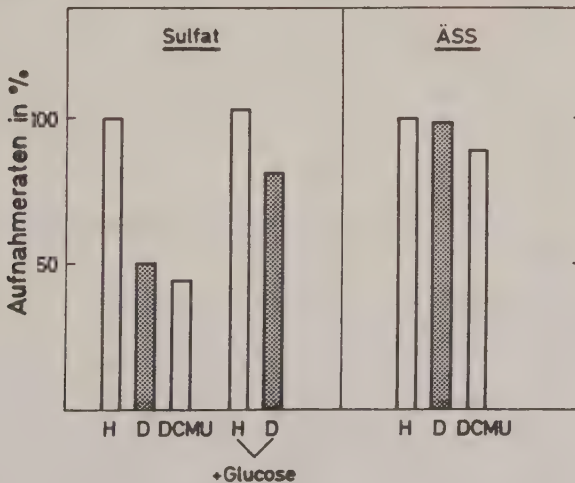


Abb.17: Hell/Dunkel-Effekt auf die $\ddot{A}$ SS- und Sulfataufnahme

Im Licht gewachsene Algenkulturen (Schwefelquelle: 0.3 mM Äthansulfonat bzw. Sulfat) wurden parallel zu Kontrollansätzen (Licht) in mit Aluminiumfolie umwickelten WARBURG-Gefäßen (Dunkelheit) inkubiert. DCMU (1 mM) und Glucose (3 mM) wurden jeweils kurz vor Versuchsbeginn in die Hell/Dunkel-Gefäße gegeben und mit der ^{35}S -markierten 0.3 mM Schwefelquelle anschließend versetzt. Die Inkubationsdauer betrug 30 Minuten. Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.9.

5.8 Inhibitoren der ÄSS-und Sulfataufnahme

5.8.1 Metabolische Inhibitoren

Mit Hilfe metabolischer Inhibitoren sollte ein erster Einblick in die Energieversorgung bzw. den Mechanismus der beiden Aufnahmeprozesse gewonnen werden. Die einzelnen Hemmstoffe wurden daher in Konzentrationen von 0.01 - 1 mM in den Aufnahmetest eingesetzt und wiesen die unterschiedlichsten Angriffspunkte im Stoffwechsel der Alge auf:

- Hemmstoffe der **Energieversorgung**
 - .- Hemmstoffe der Glycolyse (Fluorid, Jodacetat)
 - .- Hemmstoffe von Atmung/Photosynthese (Cyanid, Azid, DCMU und DMBIB (Dibromothymochinon))
- **Entkoppler** (2,4-DNP und CCCP)
- **ATPase-Hemmstoffe** (DCCD, Ouabain und Vanadat)
- Hemmstoffe des **Anionentransportes** (SITS und DIDS)

Tab.12: Beeinflussung der ÄSS/Sulfataufnahme durch metabolische Inhibitoren

Inhibitor	Konz. (mM)	ÄSS-Aufnahme (% der Kontrolle)	Sulfataufnahme (% der Kontrolle)
-.-	-.-	100	100
Natriumfluorid	1.0	115	125
Natriumjodacetat	1.0	125	150
Natriumcyanid	1.0	96	62
Natriumazid	1.0	94	67
DCMU *	1.0	89	45
"Dunkelheit"		98	51
Dibromothymochinon *	1.0	0	0
	0.1	35	84
	0.01	80	124
2,4 DNP *	1.0	33	39
CCCP *	1.0	0	0
	0.1	0	0
	0.01	112	20
DCCD *	1.0	38	13
	0.1	92	27
	0.01	112	72
Ouabain ^{II}	1.0	114	112
Natriumvanadat	1.0	78	101
SITS	1.0	78	48
DIDS	1.0	66	44
PMSF *	1.0	0	81
	0.1	63	115
	0.01	111	120
Äthanol (1 %)	117	63	105

ÄSS/Sulfat-gewachsene Algen wurden nach 3-5 Minuten Vorinkubation im Hemmstoff der angegebenen Konzentration mit ³⁵S-merktem ÄSS bzw. Sulfat versetzt. Inkubationsdauer 30 Minuten. Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.9 .

Die mit * bezeichneten Substanzen wurden in Äthanol gelöst und rechnerisch auf den Äthanol-Kontrollwert bezogen.

Die Versuchsergebnisse sind in Tab.12 zusammengestellt und zeigen deutlich die unterschiedliche Beeinflussung von $\ddot{A}$ SS-bzw. Sulfataufnahme in Chlorella fusca durch die getesteten Inhibitoren auf :

Hemmstoffe der Glycolyse (Jodacetat, Fluorid) zeigten dabei keine Beeinflussung der untersuchten Aufnahmeprozesse, wohingegen Inhibitoren der Photosynthese/Atmung gewisse Hemmeffekte besaßen. Vor allem DMBIB (Dibromothymochinon) demonstrierte die Abhängigkeit beider Transportprozesse von zellulärer Energie.

Entkoppler wie 2,4-DNP oder CCCP wiesen nach Tab.12 eine beträchtliche Hemmung von $\ddot{A}$ SS/Sulfataufnahme auf (CCCP war der wirksamste aller getesteten Inhibitoren). Auch der ATPase-Hemmstoff DCCD wirkte aufnahmehemmend, allerdings für $\ddot{A}$ SS/Sulfat in unterschiedlichem Maße: Während die $\ddot{A}$ SS-Aufnahme selbst von 1 mM DCCD nicht vollständig gehemmt wurde, reagierte die Sulfataufnahme um eine Zehnerpotenz empfindlicher auf diesen Inhibitor.

Beide Hemmstoffe des Anionentransportes (SITS und DIDS) wirkten vergleichsweise moderat auf die Aufnahmeprozesse ein (Wirkungsmechanismus, s.Diskussion).

PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) ein bekannter Hemmstoff von Enzymen, die einen Serinrest im aktiven Zentrum aufweisen (138), blockierte die $\ddot{A}$ SS-Aufnahme sehr stark - ohne gleichzeitig die Sulfataufnahme deutlich zu beeinflussen.

Auch die Wirkung von Äthanol auf Transportprozesse wurde untersucht. Äthanol, das in den mit * bezeichneten Testansätzen obligatorisch anwesend war, beeinflusste v.a. die $\ddot{A}$ SS-Aufnahme. Da jedoch viele der getesteten Inhibitoren aus Tab.12 in absolutem Äthanol aufgenommen werden mußten, wurde bei allen Versuchsreihen ein zweiter Kontrollwert mit 1 % Äthanol (= 0.17 M Äthanol/Ansatz) bestimmt.

5.8.2 SH-Gruppen Inhibitoren und Schwermetallionen

Um zu klären, inwieweit **Thiolgruppen** am $\ddot{A}$ SS/Sulfataufnahmeprozess beteiligt sind, wurden die Algen mit SH-Gruppen Reagenzien (NEM, PCMBs) und Schwermetallionen in einem gesonderten Versuchsansatz untersucht.

Die beiden Reagenzien p-Chloromercuriphenylsulfonat (PCMBs) und N-Äthylmaleimid (NEM) wurden dabei aufgrund ihrer unterschiedlichen Fähigkeit ausgewählt, die Zellmembran zu durchdringen (158, 201, 211). Sie können klassifiziert werden als:

- ein nicht-penetrierendes Reagens (PCMBs)
- ein schnell penetrierendes Reagens (NEM)

Tab.13: Beeinflussung von $\dot{\text{A}}\text{SS}$ /Sulfataufnahme durch SH-Gruppen Reagenzien und Schwermetallionen

Verbindung	$\dot{\text{A}}\text{SS}$ -Aufnahme (% der Kontrolle)	Sulfataufnahme (% der Kontrolle)
NEM*	29	36
PCMBS	3	125
Hg ²⁺ (HgCl ₂)	2	3
Cu ²⁺ (CuCl ₂)	9	153
Cd ²⁺ (CdCl ₂)	187	170

$\dot{\text{A}}\text{SS}$ /Sulfat-gewachsene Algen wurden nach 3-5 Minuten Vorinkubation im jeweiligen Hemmatoff (NEM, PCMBS - 1 mM; Schwermetallion - 3 mM) mit ³⁵S-markiertem $\dot{\text{A}}\text{SS}$ bzw. Sulfat versetzt. Die Inkubationsdauer betrug 30 Minuten. Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.9 .

Anmerkung: NEM* wurde in Äthanol gelöst und wie in Tab 12. rechnerisch auf den Äthanol-Kontrollwert bezogen.

PCMBS und NEM haben somit getrennte Wirkungsorte in/an der Alge und erlauben eine weitergehende Spezifizierung der an der Ionenaufnahme beteiligten SH-Gruppen. Beide Reagenzien wurden in 1 mM Konzentration mit der Algensuspension präinkubiert.

Tab.13 zeigt deutlich die unterschiedliche Empfindlichkeit von $\dot{\text{A}}\text{SS}$ /Sulfataufnahme gegenüber NEM und PCMBS auf: NEM hemmte beide Aufnahmeprozesse gleichermaßen zu 60-70 %, wohingegen PCMBS nur eine selektive Hemmung des $\dot{\text{A}}\text{SS}$ -Transportes bewirkte. Diese PCMBS-Wirkung war nicht durch den Einfluß der Sulfonsäuregruppe im PCMBS-Molekül allein zu erklären, da 1 mM Benzolsulfonat die $\dot{\text{A}}\text{SS}$ -Aufnahme nur zu 25 % hemmte (nicht aufgeführt).

Auch Schwermetallionen zeigten eine heterogene Wirkung: Während Hg²⁺ beide Aufnahmeprozesse zu nahezu 100 % blockierte, hemmte Cu²⁺ nur den Sulfonattransport. Cd²⁺ wirkte dagegen wie viele andere zweiwertige Metallionen aufnahmefördernd (s. 5.9.1). Auffallend v.a. der spezifische Hemmeffekt von Cu²⁺, der nicht durch eine allgemeine Kupfertoxizität der Alge erklärt werden kann, sondern zusammen mit der PCMBS-Wirkung für die Beteiligung oberflächenexponierter SH-Gruppen bei der $\dot{\text{A}}\text{SS}$ -Aufnahme spricht.

5.9 Stimulatoren der ÄSS- und Sulfataufnahme

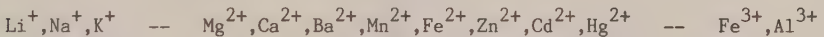
Wie mehrfach angesprochen, besitzen einige Verbindungsklassen die Eigenschaft, ÄSS- und Sulfataufnahme spezifisch zu fördern. Dazu gehören mehrwertige Kationen, anorganisches Phosphat und P-haltige Verbindungen, sowie Aminosäuren.

5.9.1 Kationeneffekte

Die meisten der getesteten Metallionen hatten einen ausgeprägten Effekt auf die ÄSS- und Sulfataufnahme in Chlorella fusca (Abb.18).

Vor allem di- und trivalente Kationen stimulierten die Aufnahmeraten 2-3 fach, wohingegen monovalente Kationen nur eine geringe Beeinflussung der Aufnahmeprozesse zeigten (Ausnahme Schwermetallionen, siehe 5.8.2).

Im einzelnen wurden getestet:



ÄSS-Aufnahme (Abb.18 oben)

Obwohl Chlorella fusca bereits in 1 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer pH 7.8 oder in 1 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7.8 gute Aufnahmeraten für 0.3 mM $\text{H}_5\text{C}_2\text{SO}_3^-\text{Na}^+$ (ÄSS) zeigte, konnten polyvalente Kationen die Aufnahme zusätzlich um den Faktor 2-3 steigern. (Ausnahme: Cu^{2+} und Hg^{2+} , siehe 5.8.2). Innerhalb der eingesetzten di- und tri-valenten Kationen wurden dabei vergleichbar hohe Stimulierungsraten gemessen; die beigefügten Anionen waren austauschbar (z.B. CaCl_2 mit $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$). Monovalente Kationen zeigten leicht positive Effekte in der Reihenfolge ihrer Ionenstärke (" NH_4 " > Li^+ > Na^+ > K^+), bewirkten insgesamt jedoch eine wesentlich geringere Stimulierung der ÄSS-Aufnahme.

Sulfataufnahme (Abb.18 unten)

Alle di- und trivalenten Kationen wirkten um den Faktor 2 gleichermaßen aufnahme-fördernd, während monovalente Kationen die Aufnahmeraten nicht beeinflussen. Eine Ausnahme stellte das Ba^{2+} -Ion dar, das eine "Steigerung" der Sulfataufnahme um 680 % bewirkte. Dieser Effekt trat bei lebenden wie bei toten Zellen auf und wurde als Präzipitation $\text{Ba}^{35}\text{SO}_4$ auf die Zelloberfläche interpretiert.

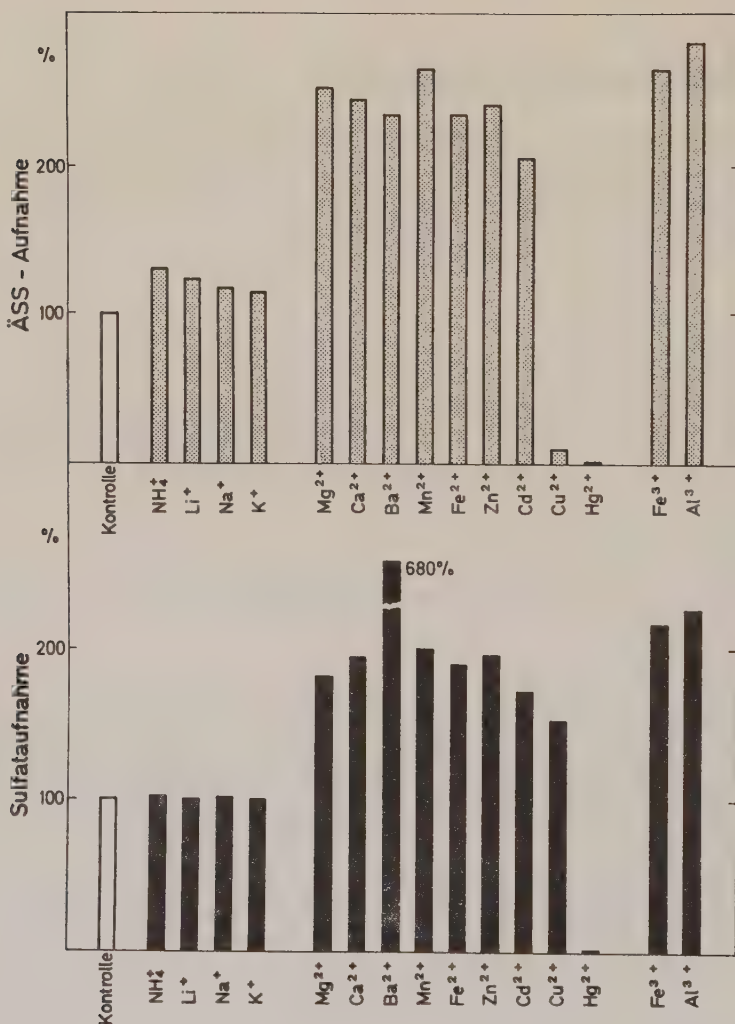


Abb.18: Beeinflussung der ^{35}S /Sulfataufnahme in *Chlorella fusca* durch ausgewählte Kationen

Mit deionisiertem Wasser gewasene ^{35}S /sulfat-gewasene Algen wurden für 3-5 Minuten mit dem zu testenden 3 mM Metallion in 1 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, pH 7.8 vorinkubiert. Alle Metallionen lagen in Form ihrer Chloridsalze vor. Der Inkubationspuffer bestand abweichend zu Abb.9 aus 1 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, pH 7.8, da SL-1 Medium zu viele verschiedene Ionen enthält, um eine Aussage über Kationeneffekte zu ermöglichen. Die Inkubationsdauer betrug 30 Minuten. Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.9.

5.9.2 Phosphateffekte

Phosphat stimulierte die $\ddot{A}$ SS-Aufnahme in Chlorella von allen bisher getesteten Verbindungen am meisten, ohne gleichzeitig die Sulfataufnahme zu fördern (Abb.19). Anorganisches Phosphat wirkte damit äußerst spezifisch und unabhängig von den beigefügten Kationen (Na^+ bzw. K^+) auf die $\ddot{A}$ SS-Aufnahme ein.

Abb.19 zeigt vergleichend die $\ddot{A}$ SS-Aufnahme in Abhängigkeit von der vorgegebenen Phosphatkonzentration im Testansatz ($\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, pH 7.8). Danach erwies sich die $\ddot{A}$ SS-Aufnahme im Bereich von 1 mM bis 100 mM Phosphat direkt proportional zum Logarithmus der Phosphatkonzentration, während bei noch höheren Konzentrationen die $\ddot{A}$ SS-Aufnahme deutlich zurückging (hohe Osmolarität des Außenmediums).

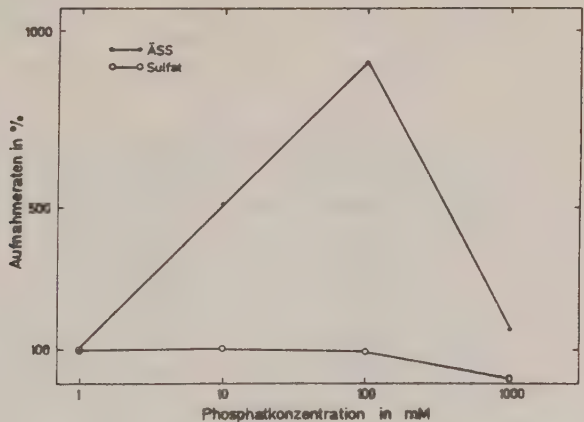


Abb.19:

Beeinflussung der
 $\ddot{A}$ SS- und Sulfataufnahme
durch die Phosphatkonz.
im Testansatz

$\ddot{A}$ SS- bzw. sulfatgewachsene Algen wurden in $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, pH 7.8 der angegebenen Konzentration suspendiert. Nach 3-5 Minuten Vorinkubation bei Zimmertemperatur wurden die $0.3 \text{ mM } ^{35}\text{S}$ -markierten Schwefelquellen zugegeben. Inkubationsdauer 30 Minuten. 100 % = Aufnahmerate in 1 mM Phosphatpuffer. Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.9.

Der **Phosphateffekt** (d.h. die Stimulierung der $\ddot{A}$ SS-Aufnahme durch extrazelluläres Phosphat) zeigte sich auch dann, wenn die Algenzellen in Phosphat nur vorinkubiert wurden. So erhöhte sich nach 15minütiger Präinkubation in 1 mM Phosphatpuffer die $\ddot{A}$ SS-Aufnahme um mehr als das 5-fache, verglichen mit dem Kontrollwert (Tab.14). Der Phosphateffekt scheint demnach weniger von der aktuellen Phosphatkonzentration im Außenmedium abzuhängen als von der relativen Verfügbarkeit an Phosphationen innerhalb der Zelle.

Tab.14: Beeinflussung der ÄSS-Aufnahme durch Präinkubation in Phosphat

Phosphat- konzentration	Präinkubation		
	keine	1 mM	100 mM
1 mM	100 %	505 %	620 %
10 mM	509 %	-. -	-. -
100 mM	890 %	-. -	-. -
1000 mM	145 %	-. -	-. -

Die Präinkubation erfolgte für 15 Minuten im WARBURG-Apparat in Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7.8 der angegebenen Konzentration (1 mM bis 100 mM). Danach wurden die Algen quantitativ aus den Gefäßen ausgespült und mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Bestimmung der ÄSS-Aufnahme erfolgte anschließend für 30 Minuten in einem 1 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, pH 7.8.

Der Versuchsansatz ohne Präinkubation wurde wie üblich mit frisch abgeernteten Algen in Puffersystemen der angegebenen Phosphatkonzentration durchgeführt. Inkubationsdauer 30 Minuten. Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.9.

Tab.15: Beeinflussung der ÄSS-Aufnahme durch Phosphat/abgeleitete Verbindungen

Verbindung (3 mM)	ÄSS-Aufnahme (% der Kontrolle)	Sulfataufnahme (% der Kontrolle)
K_2HPO_4	275	102
Phosphoenolpyruvat	155	86
CTP	158	-. -
GTP	149	-. -
ATP	161	105
ADP	127	-. -
AMP	104	-. -
Phosphoglycerinsäure	102	96
Glucose-6-phosphat	101	-. -
β -Glycerophosphat	104	-. -
Aminoäthylphosphat	187	97
Pyrophosphat	48	87
<u>Anhang</u>		
Pyruvat	98	93
Glucose	110	104
Fructose	108	110
Saccharose	115	101

ÄSS-bzw. sulfatgewachsene Algen wurden 3-5 Minuten in der zu testenden 3 mM Verbindung vorinkubiert. Alle Substanzen waren bei Bedarf neutralisiert (Na/K-Salz). Die Inkubationsdauer betrug 30 Minuten. Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.9.

Nach Tab.15 trat der **Phosphateffekt** nicht nur bei Phosphat auf sondern auch in Anwesenheit von "phosphatgruppenenthaltender Verbindungen", die möglicherweise als Phosphatgruppendonatoren dienen könnten (PEP,ATP,CTP,GTP). Verbindungen ohne energetisierte Phosphatgruppen (z.B. 3-Phosphoglycerinsäure, Glucose-6-phosphat oder β -Glycerophosphat) beeinflussen dagegen die $\dot{\text{A}}\text{SS}$ -Aufnahme nicht, ebenso wenig energiereiche Verbindungen allein (Glucose, Fructose, Saccharose).

5.9.3 Aminosäureeffekte

Nahezu alle getesteten Aminosäuren stimulierten die $\dot{\text{A}}\text{SS}$ -Aufnahme um 135-150 % (Tab.16). Eine Ausnahme bildete Arginin, das die Aufnahmerate herabsetzte. Im Gegensatz dazu, wurde die Sulfataufnahme von 3 mM konzentrierten Aminosäuren praktisch nicht beeinflusst, abgesehen von L-Cys, dessen hemmende (regulatorische) Wirkung bereits früher angesprochen wurde (5.6.2).

Tab.16: Beeinflussung von $\dot{\text{A}}\text{SS}$ /Sulfataufnahme durch Aminosäuren

Verbindung (3 mM)	$\dot{\text{A}}\text{SS}$ -Aufnahme (% der Kontrolle)	Sulfataufnahme (% der Kontrolle)
Glycin	133	103
Alanin	135	105
Valin	148	115
Leucin	144	109
Prolin	115	108
Phenylalanin	131	100
Serin	135	99
Threonin	144	98
Cystein	143	65
Methionin	141	94
Tyrosin	148	105
Asparagin	145	96
Glutamin	138	93
Asparaginsäure	135	92
Glutaminsäure	128	96
Lysin	109	99
Arginin	49	96
Histidin	120	93
β -Alanin	135	109
Cysteinsäure	144	96

$\dot{\text{A}}\text{SS}$ -bzw. sulfatgewachsene Algen wurden 3-5 Minuten in der zu testenden 3 mM Aminosäure vorinkubiert und danach wie üblich mit ^{35}S -markierter $\dot{\text{A}}\text{SS}$ bzw. Sulfat versetzt. Die L-Aminosäuren waren in destilliertem Wasser gelöst und bei Bedarf neutralisiert. Inkubationsdauer 30 Minuten. Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb. 9.

5.10 Zusammenfassung: Die "ÄSS-Permease" in Chlorella fusca

Das ÄSS-Aufnahmesystem stellt nach bisherigen Ergebnissen ein eigenständiges, enzymähnliches (carrier-vermitteltes) aktives Membrantransportsystem ("Permease") dar:

- a) Das ÄSS-Transportsystem hatte eine hohe Affinität für sein Substrat und zeigte **MICHAELIS-MENTEN-Sättigungskinetik** (5.3); ein Indiz für die endliche Anzahl von Bindungs/Transportstellen für Äthansulfonat. Der K_m -Wert der ÄSS-Aufnahme lag bei 50 μM .
- b) Der ÄSS-Transport war **temperaturabhängig** und zeigte ein Optimum bei 33 °C (5.4). Er konnte daher nicht durch einfache Diffusion erklärt werden. Die Aktivierungsenergie für diesen Transportprozeß betrug im Temperaturbereich von 18-33 °C 41.3 kJ/mol.
- c) Die ÄSS-Aufnahme war **pH-abhängig** und zeigte ein pH-Optimum bei pH 7.8 (5.5), obwohl das Substrat ÄSS über die gemessene pH-Spanne vollständig dissoziiert vorliegen sollte ($\text{H}_5\text{C}_2\text{SO}_3^- \text{Na}^+$).
- d) Die ÄSS-Aufnahme war ein **energiebenötigender/abhängiger Prozeß**, da metabolische Inhibitoren (wie z.B. DMBIB, 2,4-DNP, CCCP, DCCD) stark aufnahmehemmend wirkten (5.8.1).
- e) Die ÄSS-Aufnahme reagierte sensibel auf Zugabe von SH-Gruppen Reagenzien und gewisser Schwermetallionen (5.8.2). Der starke Hemmeffekt durch PCMBs deutete auf die Anwesenheit freier essentieller SH-Gruppen an der Außenseite des ÄSS-Aufnahmesystems hin.
- f) Die ÄSS-Aufnahme war **unidirektional** (5.3).
- g) Die ÄSS-Aufnahme wurde durch Strukturanaloga herabgesetzt, wobei alle getesteten Sulfonsäuren gleichermaßen wirkten. Monocarboxylate und andere monovalenten Anionen beeinflussten dagegen die ÄSS-Aufnahme nicht (5.6.1/5.6.2) = **Substratspezifität**
- h) Das ÄSS-Aufnahmesystem war **nicht konstitutiv** und fehlte in Sulfatkulturen (4.1/4.2), ein unspezifischer Membrandurchtritt von Äthansulfonat konnte damit ausgeschlossen werden. Die ÄSS-Aufnahme wurde jedoch nicht durch die Anwesenheit seines Substrates im Außenmedium induziert (ÄSS) sondern entwickelte sich in Abwesenheit von Schwefel/Sulfat als Antwort auf die S-Limitierung. Die Ausbildung des ÄSS-Aufnahmesystems wurde ferner durch Cycloheximid verhindert (4.3) und konnte innerhalb weniger Stunden durch Sulfatzugabe revertiert werden (4.4).

Wichtig: Alle Ergebnisse deuten darauf hin, daß ÄSS-Aufnahme in Chlorella fusca sehr verschieden von den Sulfataufnahmeprozessen abläuft. ÄSS- und Sulfatpermease stellen somit getrennte (**eigenständige**) Transportsysteme mit unterschiedlichen Charakteristika und Abhängigkeiten dar.

5.11 ANHANG: Die Sulfataufnahme in ÄSS-Kulturen

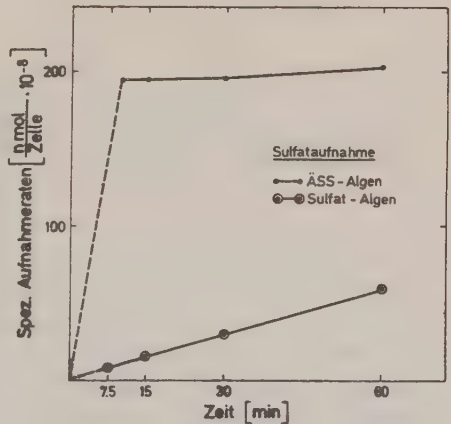
Die Sulfataufnahme in ASS-gewachsenen Kulturen unterschied sich in vielen Punkten von der Sulfataufnahme über das konstitutive Aufnahmesystem (in Sulfatkulturen). Dieser Sachverhalt sollte anhand weniger Beispiele aufgezeigt werden:

A) Zeitabhängigkeit der Aufnahme

Während die Sulfataufnahme in Sulfatkulturen innerhalb von 90 Min. linear verlief (Abb.9), war die wesentlich größere Sulfataufnahme in ÄSS-Kulturen auf die ersten Minuten nach Sulfatzugabe beschränkt (Abb.20). Danach nahm die Sulfataufnahme nur noch gering zu.

Abb.20: Zeitabhängigkeit der Sulfataufnahme in ÄSS-Algen

Die Sulfataufnahme in ÄSS-bzw. sulfatgewachsene Algen wurde über einen Zeitraum von einer Stunde kontinuierlich bestimmt. Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.9.



B) Kinetik der Sulfataufnahme

Die Abhängigkeit der Sulfataufnahme von der Sulfatkonzentration im Aufnahmetest wurde im Bereich von 1×10^{-7} M bis 3×10^{-4} M bestimmt und zeigte bei ÄSS-Algen von der konstitutiven Sulfataufnahme abweichende Aufnahmekurven (Abb.21). Vor allem bei höheren Sulfatkonzentrationen wies die Sulfataufnahme in ÄSS-Algen deutlich lineare Anteile/überschießende Aufnahmeraten auf, während bei geringeren Konzentrationen (bis zu 0.01 mM) die Aufnahmeraten beider Sulfattransportsysteme nahezu übereinstimmte.

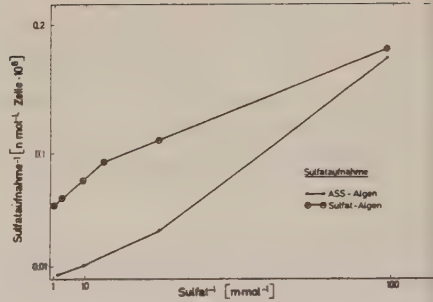
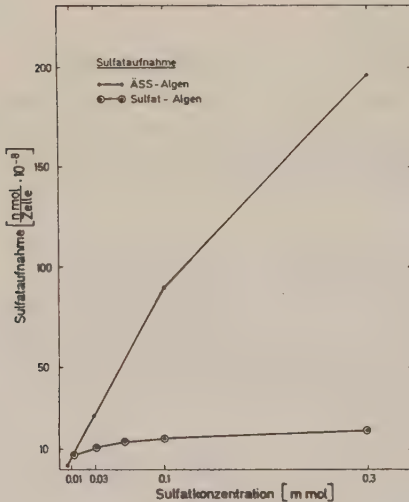


Abb.22: LINEWEAVER-BURK-Darstellung

Abb.21: Konzentrationsabhängigkeit der Sulfataufnahme

Abb.21: ASS- bzw. sulfatgewachsene Algen wurden in SL-1 Medium unterschiedlicher Sulfatkonzentration (3×10^{-6} M bis 3×10^{-4} M) inkubiert. Die Aufnahmeraten wurden aus zwei Versuchsreihen bestimmt. Inkubationsdauer 30 Minuten. Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.9.

Abb.22: Doppelt reziproke Umsetzung der Daten aus Abb.21 (Konzentrationsabhängigkeit)

Die doppelt reziproke Darstellung dieser Daten nach LINEWEAVER-BURK ergab bei niedrigen Sulfatkonzentrationen (bis 0,01 mM Sulfat) eine Gerade, aus der sich ein K_m -Wert von 1×10^{-5} M berechnen ließ (nicht eingezeichnet).

Bei höheren Sulfatkonzentrationen war die Aufnahmekurve dagegen konkav nach oben gebogen (Abb.22) und ergab negative Werte für K_m bzw. V_{max} . Sie war damit nach Maßstäben einer klassischen MICHAELIS-MENTEN-Kinetik nicht zu interpretieren und schien sich aus zwei oder mehreren Anteilen zusammensetzen. Ähnliche Aufnahmekinetiken wurden auch von anderen Transportsystemen beschrieben, bei denen eine anfängliche schnelle Aufnahmephase über eine spätere geringere Gleichgewichtsphase dominierte (siehe 157).

Im Gegensatz dazu wies das konstitutive Sulfataufnahmesystem in Chlorella fusca im Bereich von 5×10^{-7} M bis 1×10^{-2} M Sulfat nach LINEWEAVER-BURK Darstellung eine triphasische Aufnahmekurve auf (siehe auch 142):

Phase I (5×10^{-7} M bis 6×10^{-5} M) : $K_m = 1,2 \times 10^{-5}$ M

Phase II (6×10^{-5} M bis 1×10^{-3} M) : $K_m = 4,0 \times 10^{-5}$ M

Phase III (1×10^{-3} M bis 1×10^{-2} M) : $K_m = 2,8 \times 10^{-4}$ M

Wichtig: Die K_m -Werte beider Sulfataufnahmesysteme in Chlorella fusca zeigten bei geringen Sulfatkonzentrationen (Phase I) eine ziemlich gute Übereinstimmung, ein Hinweis darauf, daß bei S-Mangelbedingungen kein neues Sulfataufnahmesystem mit erhöhter Substrataffinität ausgebildet wurde sondern das bestehende Aufnahmesystem mit erhöhter Effektivität zu arbeiten begann (s.Diskussion).

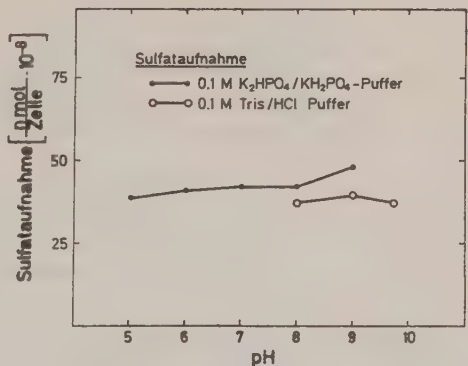
C) pH-Abhängigkeit der Sulfataufnahme

Die Sulfataufnahme in ÄSS-Algen wies nur gering ausgeprägte pH-Abhängigkeit auf (Abb.23). In beiden Puffersystemen ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer bzw. Tris/HCl-Puffer) veränderte sich die Sulfataufnahme mit steigendem pH (5.0-10.0) relativ wenig, zeigte aber andeutungsweise ein pH-Optimum in der Gegend von pH 9.0 .

Abb.23: pH-Abhängigkeit
der Sulfataufnahme
in ÄSS-Algen

Nach 3-5 Minuten Vorinkubation im jeweiligen 0.01 M Puffersystem wurden die ÄSS-gewachsenen Algen mit $0.3 \mu\text{M}$ ^{35}S -Sulfat versetzt. Inkubationsdauer 30 Minuten. Weitere Versuchsbedingungen Abb.9 .

Puffersystem A: 0.01 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, pH 5.0-9.0
Puffersystem B: 0.01 M Tris/HCl-Puffer, pH 8.0-10.0



D) Temperaturabhängigkeit der Sulfataufnahme

Die Sulfataufnahme in ÄSS-Algen zeigte wie in Sulfatalgen ein Temperaturoptimum bei 43°C (Abb.24).

Allerdings wies die Sulfataufnahme in ÄSS-Kulturen (mit Ausnahme des auffallend gut ausgeprägten Optimums) eine deutlich geringere Temperaturabhängigkeit auf. So betrugen die Q_{10} -Werte im suboptimalen Temperaturbereich nur Beträge um 1.2 und lagen damit weit unter den Q_{10} -Daten von Sulfatkulturen (Tab.17/10).

Tab.17: Q_{10} -Werte der Sulfataufnahme in ÄSS-Algen

Temperaturbereich	Q_{10} (Sulfat)
18-28 °C	1.2
23-33 °C	1.1
28-38 °C	1.2
33-43 °C	(2.7)

Abb.25 zeigt das Arrhenius-Diagramm der Sulfataufnahme in ÄSS-Algen (rechts). Die graphische Umsetzung der Temperaturabhängigkeit () ergab eine biphasische Arrhenius-Gerade mit einer Diskontinuität bei 38 °C. Aus der Steigung dieser Geradenabschnitte konnten die Beträge der Aktivierungsenergien ermittelt werden:

- sie lagen im Temperaturbereich von 18-38 °C bei 15.1 kJ/mol (und damit relativ niedrig für die Aufnahme eines zweifach negativ geladenen Anions in Chlorella fusca (5.4))
- zwischen 38 °C und 43 °C stieg sie auf über 163.0 kJ/mol an (obwohl bei höheren Temperaturwerten sonst eher geringere Aktivierungsenergien vorliegen)

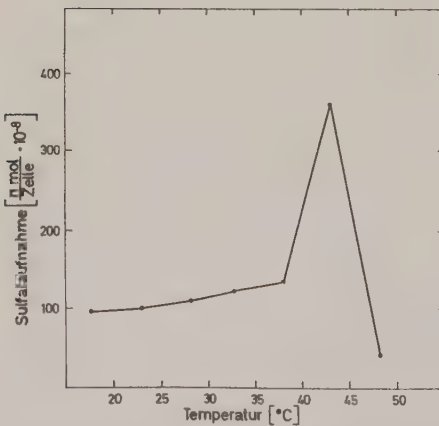


Abb.24: Temperaturabhängigkeit der Sulfataufnahme in ÄSS-Algen

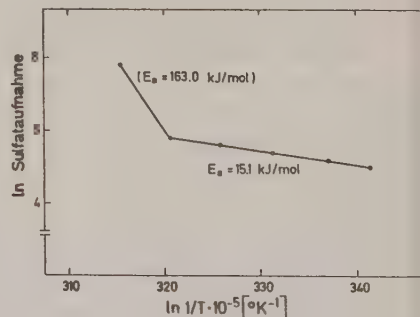


Abb.25: Arrhenius-Diagramm

Abb.24: ÄSS-gewachsene Algen wurden nach dem Waschen ohne Vorinkubation (Temperaturadaptation) in den Aufnahmetest bei der jeweiligen Temperatur eingesetzt. Inkubationsdauer 15 Minuten. Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.9 .

Abb.25: Graphische Umsetzung der Daten aus Abb.24 .

E) Substratspezifität der Sulfataufnahme

Kompetitionsversuche zeigten, daß Sulfataufnahmeprozesse v.a. durch Anionen des Typus XO_4^{2-} gehemmt wurden ($\text{CrO}_4^{2-} \gg \text{SeO}_4^{2-} > \text{MoO}_4^{2-} = \text{WO}_4^{2-}$). Dieser Hemmeffekt aufgrund Struktur analogie war bei der Sulfataufnahme in ÄSS- und Sulfatkulturen gleichermaßen stark ausgeprägt und wurde hier daher nicht weiter ausgeführt.

F) Zusammenfassung: Die Sulfataufnahme in ÄSS-Algen

Die Sulfataufnahme in ÄSS-Algen weist folgende Charakteristika auf:

- schnelle Aufnahmeraten zu Beginn der Inkubation
- MICHAELIS-MENTEN-Kinetik bei niedrigen Substratkonzentrationen und einen Km-Wert von 10 μM
- stark überschießende Aufnahmeraten bei höheren Substratkonzentrationen (keine MICHAELIS-MENTEN-Kinetik)
- gering ausgeprägte pH-Abhängigkeit
- Temperaturoptimum bei 43 °C
- im suboptimalen Bereich geringe Temperaturabhängigkeit und niedrige Aktivierungsenergien (15.1 kJ/mol)
- ab 38 °C erhöhte Aktivierungsenergie (163.0 kJ/mol)
- Substratspezifität gegenüber Anionen des Typus XO_4^{2-}

Insgesamt gesehen, unterschied sich die Sulfataufnahme in ÄSS-Algen deutlich von dem entsprechenden Aufnahme prozeß in Sulfatkulturen und widersprach damit dem oft angewandten "Trick", zum besseren Experimentieren Organismen auf S-arme Medien umzusetzen. Zwar lassen sich dadurch die gemessenen Sulfataufnahmeraten erhöhen, es ist aber nicht mehr gewährleistet, daß das untersuchte Aufnahmesystem identisch mit dem System unter Normalbedingungen ist (siehe 134).

6. Charakterisierung der Taurinaufnahme in Chlorella fusca

Wie in Kap.3/4 gezeigt, kann Chlorella fusca neben Äthansulfonsäure auch **Taurin** (2-Aminoäthansulfonsäure) in die Zelle aufnehmen und als Schwefelquelle nutzen.

Taurin, eine der biologisch wichtigsten natürlichen Sulfonsäuren, zeigt hierbei eine kompetitive Hemmung der ÄSS-Aufnahme (Abb.14) und scheint somit vordergründig ein alternatives Substrat des "ÄSS-Aufnahmesystems" darzustellen. Aufgrund seiner besonderen Struktur als β -Aminosulfonsäure lassen sich jedoch auch andere Systeme postulieren, mit deren Hilfe Taurin in die Zelle aufgenommen werden kann:

- 1- Aufnahme über ein **Sulfonsäure-Aufnahmesystem**
(analog zur ÄSS-Aufnahme)
- 2- Aufnahme über ein **Aminosäure-Transportsystem**
(analog zur β -Alanin Aufnahme)
- 3- Aufnahme über ein eigenständiges **Taurin-Aufnahmesystem**
(analog zu den Verhältnissen bei Bakterien)

Kapitel 6 beschreibt zwei dieser Möglichkeiten, die in Chlorella fusca abhängig von den vorgegebenen S/N-Mangelbedingungen realisiert vorliegen (Möglichkeit 1,2). Im Anhang dieses Kapitels (6.4) schließt sich ferner eine kurze Charakterisierung der Taurinaufnahme in andere photosynthetische Organismen an.

6.1 Taurinaufnahme unter Sulfat/Schwefel-Mangelbedingungen

In Sulfat-Mangelzellen der Alge (z.B. bei Kultivation auf Taurin) wurden sowohl ³⁵S-Äthansulfonsäure wie Taurin aufgenommen. Ausbildung und Zurückbildung der beiden Aufnahmeprozesse erfolgte zeitlich gleichlaufend und schien den gleichen Prinzipien/Regulationsmechanismen zu gehorchen.

Es schien daher interessant zu klären, inwieweit ÄSS- und Taurinaufnahme auch in den Charakteristika der Aufnahmedaten übereinstimmten - und damit möglicherweise als parallele Funktionen eines gemeinsamen Aufnahmesystems anzusehen wären.

6.1.1 Substratabhängigkeit und Kinetik des Taurintransportes

Die Aufnahmeraten in Taurinkulturen waren abhängig von der Taurinkonzentration im Medium und zeigten im Bereich von 10^{-6} M bis 10^{-2} M Taurin/Testansatz eine hyperbolische MICHAELIS-MENTEN-Sättigungskinetik (Abb.26).

Die doppelt reziproke Darstellung dieser Daten nach LINEWEAVER-BURK ergab eine biphasische Aufnahmekurve (Abb.26) und ähnliche K_m -Werte wie bei der ÄSS-Aufnahme:

Phase I (1×10^{-6} M bis 5×10^{-5} M) : $K_m = 5,5 \times 10^{-5}$ M

Phase II (5×10^{-5} M bis 1×10^{-2} M) : $K_m = 4,0 \times 10^{-4}$ M

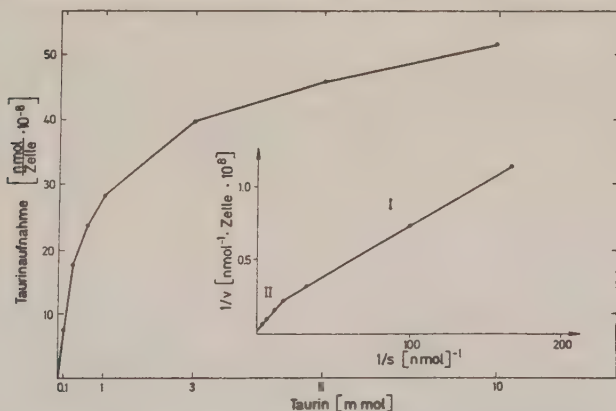


Abb.26: Konzentrationsabhängigkeit der ÄSS-Aufnahme (K_m -Wert)
und Darstellung nach LINEWEAVER-BURK

Die Transportraten wurden aus drei Versuchsreihen bestimmt. Die Inkubationsdauer betrug 30 Minuten.
Das verwendete Algenmaterial bestand aus 5 Tage alten Taurinkulturen. Weitere Versuchsbedingungen Abb.9 .

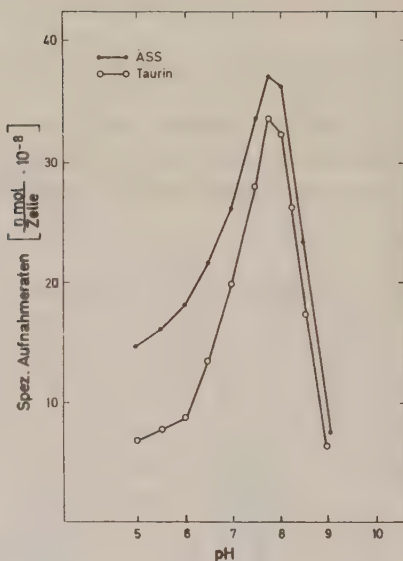
6.1.2 pH-Abhängigkeit

Die Taurinaufnahme in Taurinalgen zeigte eine deutliche pH-Abhängigkeit (Abb.27) und stimmte auffallend mit der ÄSS-Aufnahme überein. Das pH-Optimum lag in beiden Fällen bei pH 7.8.

Diese Übereinstimmung des ÄSS- und Taurinaufnahmeverhaltens war etwas überraschend, da Taurin als β -Aminosulfonsäure je nach pH auch als neutral geladenes Zwitterion vorliegen kann (im Gegensatz zum permanent negativ geladenen ÄSS-Anion).

Abb.27: pH-Abhängigkeit der
Taurin/ÄSS-Aufnahme

Nach 3-5 Minuten Vorinkubation in 0.01 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, pH 5.0-9.0 wurden die tauringewachsenen Algen wie üblich in den Aufnahmetest eingesetzt. Die Inkubationsdauer betrug 30 Minuten. Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.9 .



6.1.3 Substratspezifität

Die Spezifität des Taurin-Aufnahmesystems in Chlorella fusca (Sulfat-Limitierung) wurde analog zu 5.6 durch "Kompetitionsversuche" bestimmt, indem die zu testenden unmarkierten Verbindungen in 10-facher Konzentration in den Aufnahmetest eingesetzt wurden. Die Ergebnisse sind in Abb.28 graphisch zusammengestellt.

a) Sulfonsäuren (Abb.28A)

Alle Sulfonsäuren beeinflussten die Taurinaufnahme unter diesen Bedingungen und konkurrierten untereinander. Die Aufnahmehemmung war mehr oder weniger gleich stark, unabhängig von der chemischen Natur benachbarter funktioneller Gruppen im Molekül und entsprach der Wirkung höher- und niederkettiger Homologa des Taurins.

b) Aminoäthylsulfat (Abb.28A)

Trotz Sulfatesterbindung hemmte diese Verbindung die Taurinaufnahme gleich stark wie eine Sulfonsäure (z.B. Taurin).

c) β -Alanin (Abb.28B)

Das "C-Analogon" zu Taurin (Carboxyl-statt Sulfonsäuregruppe) beeinflusste dagegen die Taurinaufnahme nicht.

d) Aminosäuren (Abb.28B)

Keine der getesteten Aminosäuren (Gly, Ala, Val, Pro, Phe, Ser, Thr, Cys, Met, Lys, Arg, His, Gln, Asn) hemmte die Taurinaufnahme in tauringewachsenen Algen.

e) Schwefelanionen und andere Schwefelverbindungen (Abb.28C)

Die Taurinaufnahme wurde wie die ÄSS-Aufnahme (Abb.16) zu einem geringen Anteil durch die "anorganischen" Sulfonsäureanaloga gehemmt (Thiosulfat, Tetrathionat), nicht jedoch durch die anderen getesteten Schwefelverbindungen (Sulfat, Sulfit, Cyst(e)in, Methionin).

Zusammenfassend wies damit das Taurinaufnahmesystem unter Sulfat-Limitierung die gleiche **Substratspezifität** wie das früher beschriebene ÄSS-Aufnahmesystem auf (5.6):

"Struktureller Bedarf für die Reaktion mit dem Taurinaufnahmesystem ist nur die **Sulfonsäuregruppe** selbst. Es gibt keine Präferenzen für bestimmte Verbindungen. Sulfonsäuren mit den unterschiedlichsten funktionellen Gruppen werden gleichermaßen erkannt und hemmen den Transport von Taurin (bzw. ÄSS).

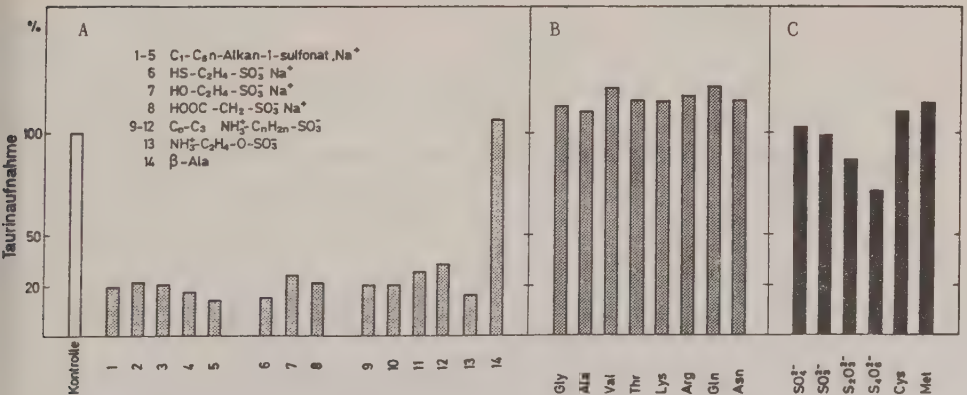


Abb.28: Substratspezifität der Taurinaufnahme unter Sulfat-Limitierung

Tauringewachsene Algen wurden für 3-5 Minuten in der zu testenden unmarkierten 3 mM Verbindung vorinkubiert. Alle Substanzen lagen neutralisiert und in Form ihrer Na-Salze vor. Die Inkubationsdauer betrug 30 Minuten. Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.9.

6.1.4 Inhibitoren der Taurinaufnahme

Mit Hilfe ausgewählter metabolischer Inhibitoren sollte ein erster Einblick in Energieversorgung/Mechanismus der Taurinaufnahme gewonnen werden. Die getesteten Hemmstoffe waren zumeist identisch mit den früher angewandten (5.8) und besaßen verschiedene Angriffspunkte im Stoffwechsel der Alge. Zusätzlich kam Monensin (Na-Ionophor und spezifischer Hemmstoff Na^+ -gekoppelter Prozeße) zum Einsatz.

Die Versuchsergebnisse sind in Tab.18 zusammengestellt und zeigen deutlich die ähnliche Beeinflussung von Taurin/ÄSS-Aufnahme durch die gewählten Hemmstoffe auf.

Tab.18: Beeinflussung von Taurin/ÄSS-Aufnahme durch metabolische Inhibitoren

Inhibitor	Konz. (mM)	Taurinaufnahme (% der Kontrolle)	ÄSS-Aufnahme (% der Kontrolle)
-.-		100	100
Natriumfluorid	1.0	112	115
Natriumjodacetat	1.0	98	125
Natriumcyanid	1.0	94	96
Natriumazid	1.0	48	94
Dibromothymochinon *	1.0	0	0
	0.1	28	35
	0.01	82	80
2,4-DNP *	1.0	27	31
CCCP *	1.0	0	0
	0.1	0	0
	0.01	82	120
DCCD *	1.0	17	38
	0.1	81	92
	0.01	99	120
Ousabain *	1.0	114	114
Natriumvanadat	1.0	48	83
SITS	1.0	83	78
DIDS	1.0	63	66
Monensin "	1.0	35	53
	0.1	58	75
	0.01	111	111
NEM *	1.0	39	29
PCMBS	1.0	2	3
Äthanol (1%)	117	65	63

Tauringewachsene Algen wurden nach 3-5 Minuten Vorinkubation im Hemmstoff der angegebenen Konzentration mit ^{35}S -markierten Taurin/ÄSS versetzt. Inkubationsdauer 30 Minuten. Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.9 .

Die mit * bezeichneten Substanzen wurden in Äthanol gelöst und auf den Äthanol-Kontrollwert bezogen.

Wie die ASS-Aufnahme (Tab.12) wurde auch die Taurinaufnahme von Inhibitoren der Glycolyse nicht beeinflusst und nur teilweise von Inhibitoren der Photosynthese und Respiration. Vor allem Dibromothymochinon wirkte in höheren Konzentrationen stark aufnahmehemmend.

Entkoppler wie 2,4-DNP und CCCP zeigten beträchtliche Hemmung der Taurinaufnahme; CCCP war in beiden Fällen der wirksamste aller getesteten Inhibitoren. Auch der ATPase-Inhibitor DCCD wirkte aufnahmehemmend, wohingegen andere ATPase-Hemmstoffe die Taurinaufnahme nur gemäßigt (Vanadat) oder überhaupt nicht hemmten (Ouabain). Monensin, ein spezifischer Hemmstoff Na^+ -abhängigen Transportes (12), beeinflusste dagegen die Aufnahmeprozesse vergleichsweise moderat.

SH-Gruppen Reagenzien hemmten die Taurinaufnahme deutlich (NEM, PCMBs), v.a. das nicht-penetrierende Reagens PCMBs war äußerst wirksam, was auf die Anwesenheit oberflächenexponierter SH-Gruppen im Aufnahmesystem hindeutet.

Auch die negative Wirkung von Äthanol auf die Taurinaufnahme wurde untersucht. Äthanol, das in den mit * markierten Aufnahmetesten obligatorisch anwesend war, beeinflusste die Taurinaufnahme in derselben Größenordnung wie die ASS-Aufnahme.

6.1.5 Stimulatoren der Taurinaufnahme

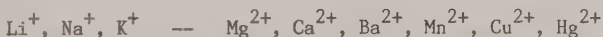
6.1.5.1 Phosphateffekt

Phosphat stimulierte die Taurinaufnahme in ähnlicher Weise wie die ASS-Aufnahme. Analog zu Abb.19 war die Taurinaufnahme abhängig von der Phosphatkonzentration im Aufnahmetest (nicht eingezeichnet) bzw. von der Präinkubation in phosphathaltigem Medium (siehe auch Tab.19) und schien in gleichem Maße über die Verfügbarkeit an Phosphationen innerhalb der Zelle reguliert zu sein (5.9.2).

6.1.5.2 Kationeneffekt

Im Gegensatz zur ASS/Sulfataufnahme wirkten (polyvalente) Kationen äußerst gering auf die Taurinaufnahme in Chlorella fusca ein (Abb.29).

Im einzelnen wurden getestet:



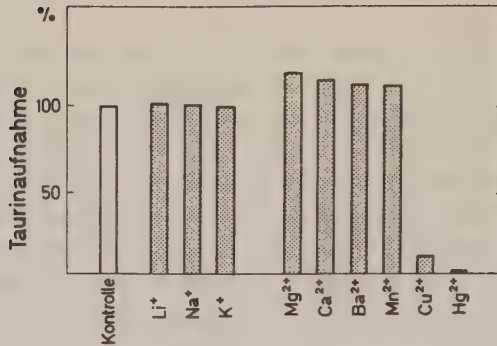


Abb.29: Beeinflussung der Taurinaufnahme durch ausgewählte Kationen

Mit deionisiertem Wasser gewaschene tauringewachsene Kulturen wurden für 3-5 Minuten mit dem zu testenden 3 mM Metallion in 1 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, pH 7.8 vorinkubiert. Alle Metallionen lagen in Form ihrer Chloridsalze vor. Die Inkubationsdauer betrug 30 Minuten. Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.9 .

Divalente Kationen stimulierten die Aufnahmeraten in 1 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, pH 7.8 nur geringfügig, während monovalente Kationen keine Beeinflussung der Taurinaufnahme zeigten (z.B. Na^+). Schwermetallionen (Hg/Cu^{2+}) wirkten dagegen deutlich aufnahmehemmend.

Die Unabhängigkeit der Aufnahmeprozesse von der herrschenden Na^+ -Konzentration im Aufnahmetest wurde noch einmal gesondert in Tab.19 aufgezeigt: Danach konnte Taurinaufnahme auch in Abwesenheit von Na^+ stattfinden und wurde andererseits durch erhöhte Na^+ -Konzentrationen im Test nicht gefördert.

Tab.19: Beeinflussung der Taurinaufnahme in Chlorella fusca durch Variation der vorgegebenen Na^+ -Konzentration

Na^+ -Konzentration	Taurinaufnahme
SL-1 Medium (ohne Na^+)	100 %
$\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer	
-.-	250 %
0.1 mM NaCl	265 %
1 mM NaCl	256 %
10 mM NaCl	259 %

Tauringewachsene Algen wurden nach 3-5 Minuten Vorinkubation in Puffersystemen der angegebenen Zusammensetzung mit 0.3 mM ^{35}S -Sulfat versetzt. Inkubationsdauer 30 Minuten. Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.9 und Tab.19.

6.2 Taurinaufnahme unter Nitrat/Stickstoff-Mangelbedingungen

Wurde Chlorella fusca auf N-Mangelmedium kultiviert (Nitratgehalt 0 - 0.25 mM), so konnte im Gegensatz zu Äthanolonsäure Taurinaufnahme festgestellt werden, allerdings in relativ geringem Ausmaß (Tab.20).

Dieses Ergebnis widerspricht zum ersten Mal der bisher beobachteten auffallenden Übereinstimmung von ÄSS- und Taurinaufnahme in Chlorella fusca (Kap.3/4/6.1) und legt die Vermutung nahe, daß Taurin unter N-Limitierung nicht als Sulfonsäure sondern als **β -Aminosäure** aufgenommen wird.

Tab.20: Taurinaufnahme in Chlorella fusca bei S/N-Mangelbedingungen

Ernährungsstatus	Taurinaufnahme	ÄSS-Aufnahme	Sulfataufnahme
Kontrolle	0	0	610
N-Mangel (N/30)	46	0	55
S-Mangel	960	1224	4146
N- und S-Mangel	1022	1200	3930

Nach 7 Tagen Wachstum auf den entsprechenden Medien wurden die Algen wie üblich geerntet und auf Taurin/ÄSS/Sulfataufnahme untersucht. Inkubationsdauer 30 Minuten. Weitere Versuchsbedingungen Abb.9 .

6.2.1 Ausbildung eines Taurinaufnahmesystems bei N-Mangel

6.2.1.1 Entwicklung der Taurinaufnahme nach Umsetzung auf N-Mangelmedium

Auf SL-1 Medium (7.25 mM Nitrat) gewachsene Algen wurden geerntet, mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen und zu gleichen Teilen auf je zwei Pirsonflaschen mit SL-1 Medium (Nitrat) und N-Mangelmedium (ohne Nitrat) aufgeteilt. Die Sulfatversorgung war mit 0.3 mM Na_2SO_4 in allen Fällen ausreichend.

Die Aufnahmezeiten für ^{35}S -markiertes Taurin/Sulfat wurden bis zu 24 Stunden nach Umsetzung gemessen und sind in Tab.21 zusammengestellt.

Tab.21: Taurin/Sulfataufnahme nach Umsetzung auf N-Mangelmedium

Zeit in Std. nach Umsetzung	N-Mangelmedium		SL-1 Medium	
	Taurin- aufnahme	Sulfat- aufnahme	Taurin- aufnahme	Sulfat- aufnahme
t = 0	0	320	0	335
t = 1	0	322	0	341
t = 2	0	336	0	344
t = 3,5	0	330	0	338
t = 5	0	342	0	241
t = 8	0	338	0	346
t = 24	18	24	0	326

Nitratgewachsene Algen (SL-1 Medium) wurden geerntet, mehrmals mit N-freiem Medium gewaschen und auf Pirsonflaschen mit SL-1 Medium und N-Mangelmedium verteilt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und bezüglich Taurin/Sulfataufnahme analysiert. Inkubationsdauer 30 Minuten. Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.9 .

Aus den Aufnahmedaten in Tab.21 geht eindeutig hervor, daß Taurin erst nach einer lag-Phase von mindestens 8 Stunden aufgenommen werden kann (zum Vergleich: Taurin-aufnahme nach Umsetzung auf S-Mangelmedium erfolgte bereits nach 2.5 Stunden). Parallel zur Ausbildung der Taurinaufnahme nahm die Sulfataufnahme innerhalb von 24 Stunden auf mehr als 1/15 ab. Sie repräsentierte damit wie bei S-Mangelzuständen ein gutes Maß für den veränderten Bedarf an Schwefel im Stoffwechsel der Alge.

6.2.1.2 Entwicklung der Taurinaufnahme in N/30-Kulturen

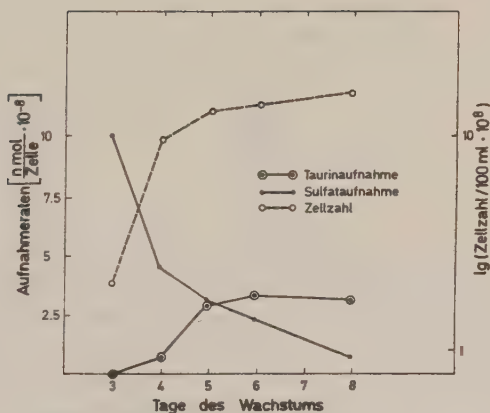
Chlorella fusca wurde bei ausreichender Sulfatversorgung auf 0.25 mM Nitrat im Ausgangsmedium kultiviert (N/30) und ab dem 3.Tag auf Zellzahl/ml (als Maß für das Wachstum) und Taurin/Sulfataufnahme untersucht (Abb.30).

Erste Mangelsymptome bei N/30-Kulturen wurden danach zwischen Tag 3 und Tag 4 festgestellt (rein optisch von einem deutlichen Farbumschlag der Kulturen von grün nach gelb begleitet):

- beginnender Wachstumsstillstand (rel.gleichbleibende Zellzahlen)
- auffallender Rückgang der Sulfataufnahme
- beginnende Taurinaufnahme

Die Taurinaufnahme erreichte nach 6 Tagen Wachstum auf N/30 -Medien ein Maximum und wurde deshalb üblicherweise am Tag 7 bestimmt.

Abb.30: Ausbildung der
Taurinaufnahme
in N/30-Kulturen



Auf 0.25 mM Nitrat (N/30) gezogene Kulturen wurden ab Tag 3 täglich Proben entnommen und auf Zellzahl (2.1.3), Taurin- und Sulfataufnahme (2.7) untersucht. Inkubationsdauer 30 Minuten. Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.9.

6.2.2 Charakterisierung der Taurinaufnahme bei N-Mangel

6.2.2.1 Substratabhängigkeit und Kinetik des Taurintransportes

Die Taurinaufnahme in N/30-Mangelkulturen wurde in Abhängigkeit von der Taurinkonzentration im Aufnahmetest bestimmt (6×10^{-5} M bis 10^{-2} M). Die Aufnahmeraten zeigten bei niedrigen Konzentrationen MICHAELIS-MENTEN-Kinetik und bei höheren Substratkonzentrationen eine nahezu lineare Abhängigkeit der Taurinaufnahme von der vorgegebenen Taurinkonzentration (Abb.31).

Die doppelt reziproke Darstellung dieser Daten nach LINEWEAVER-BURK ergab eine biphasische Aufnahmekurve (Abb.31) mit deutlich höheren K_m -Werten als für die Taurinaufnahme unter S-Mangel:

Phase I (6×10^{-5} M bis 6×10^{-4} M) : $K_m = 1.1 \times 10^{-3}$ M

Phase II (6×10^{-4} M bis 1×10^{-2} M) : $K_m = 1.0 \times 10^{-2}$ M

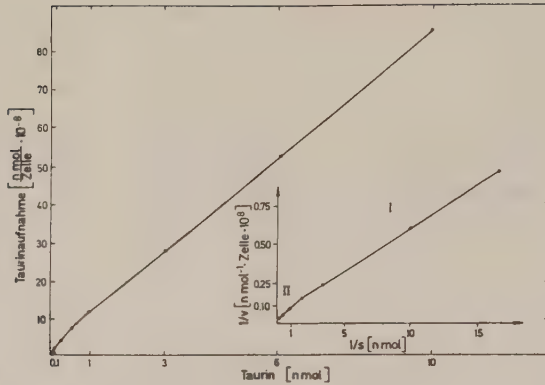


Abb.31: Konzentrationsabhängigkeit der Taurinaufnahme in N/30-Kulturen und Darstellung nach LINEWEAVER-BURK

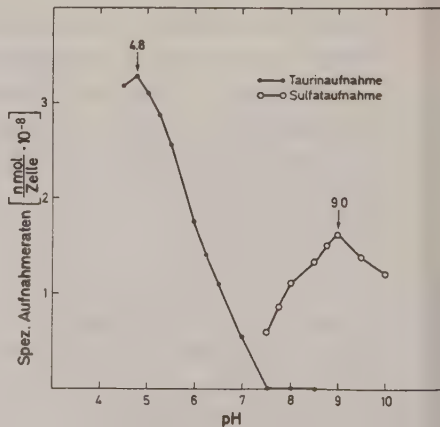
Die Transportraten wurden aus zwei Versuchsreihen bestimmt. Die Inkubationsdauer betrug 30 Minuten. Das verwendete Algenmaterial bestand aus 7 Tage alten N/30-Kulturen. Weitere Versuchsbedingungen Abb.9 .

6.2.2.2 pH-Abhängigkeit der Taurinaufnahme

Die Taurinaufnahme in N/30-Mangelkulturen wies nach Abb.32 eine deutlich andere pH-Abhängigkeit auf wie die früher untersuchte Taurinaufnahme in S-Mangelkulturen (vgl.Abb.27). Das pH-Optimum lag im sauren Bereich bei pH 4.8.

Abb.32: pH-Abhängigkeit der Taurin/Sulfataufnahme in N/30-Kulturen

Nach 3-5 Minuten Vorinkubation in 0.01 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, pH 4.5-9.0, wurden die Algen mit 0.3 mM ^{35}S -Taurin versetzt. Parallel dazu wurden die Algen in 0.01 M Tris/HCl-Puffer, pH 7.5-10.0 inkubiert und zur Bestimmung der Sulfataufnahme mit 0.3 mM ^{35}S -Sulfat versetzt. Inkubationsdauer 30 Minuten. Das verwendete Algenmaterial bestand aus 7 Tage alten N/30-Kulturen. Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.9 .



Die parallel bestimmte Sulfataufnahme in N/30-Mangelkulturen zeigte dagegen die gleiche pH-Abhängigkeit (pH-Optimum bei pH 9.0) wie in sulfatgezogenen Kulturen (5.5), obwohl die Aufnahmeraten selbst relativ niedrig waren. Demzufolge lag bei N/30-Mangelbedingungen das übliche Sulfataufnahmesystem vor, dessen Aktivität allerdings von der Alge als ganzes reduziert worden war.

6.2.2.3 Substratspezifität

Die Spezifität des Taurinaufnahmesystems unter N-Mangel wurde wie üblich durch Wettbewerbsversuche bestimmt, indem die zu testenden unmarkierten Verbindungen in 10-facher Konzentration in den Aufnahmetest eingesetzt wurden.

Die Ergebnisse sind in Abb.33 graphisch zusammengestellt.

a) Sulfonsäuren (Abb.33A)

Keine der getesteten Sulfonsäuren beeinflusste die Taurinaufnahme (nicht einmal unmarkiertes Taurin senkte in 10-fachem Überschuß die Aufnahme von ^{35}S -Taurin ab, da in diesem Bereich der Aufnahmerückgang infolge spezifischer Isotopenverdünnung um den Faktor 10 durch entsprechend erhöhte Aufnahme kompensiert wurde (s.Abb.31)).

b) β -Alanin (Abb.33A)

β -Alanin senkte die Taurinaufnahme auf 15 % des Ausgangswertes ab.

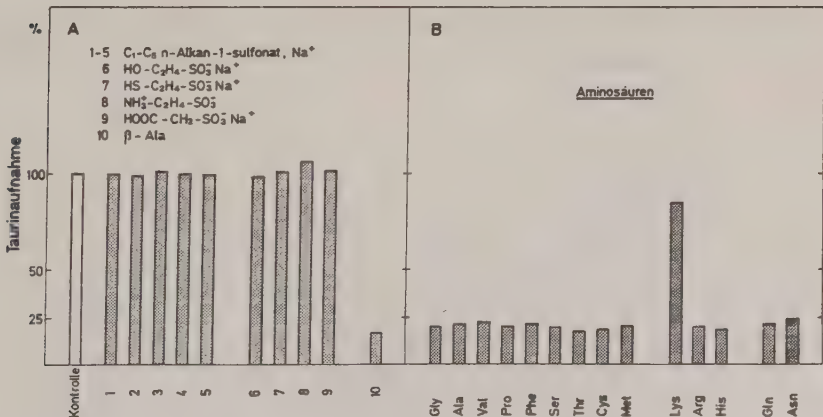


Abb.33: Spezifität des Taurinaufnahmesystems unter N-Mangel

N/30-Kulturen wurden am 7.Tag geerntet, mehrmals gewaschen und für 3-5 Minuten in der zu testenden unmarkierten 3 mM Verbindung vorinkubiert. Alle Verbindungen lagen neutralisiert und in Form ihrer Na-Salze vor. Die Inkubationsdauer betrug 30 Minuten. Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.9 .

c) Aminosäuren (Abb.33B)

Wie β -Alanin beeinflussten nahezu alle getesteten Aminosäuren die Taurinaufnahme negativ: Gly, Ala, Val, Pro, Phe, Ser, Thr, Cys, Met, Arg, His, Gln und Asn. Die Aufnahmehemmung war bei diesen Aminosäuren in etwa gleich stark und unabhängig von der chemischen Natur noch vorhandener funktioneller Gruppen.

Zusammenfassend wies damit das Taurin-Aufnahmesystem folgende **Präferenzen** auf:

"Im Gegensatz zu S-Mangelbedingungen konkurrierten andere Sulfonsäuren nicht um Erkennung/Aufnahme in die Zelle. Strukturelle Voraussetzung für die Reaktion mit dem Aufnahmesystem unter N-Mangel ist daher nicht die Sulfonsäuregruppe sondern die " β -Aminosäure Funktion" Taurins."

6.2.3 Wachstum auf Taurin als einziger N-Quelle

Obwohl Chlorella fusca bei N-Mangel Taurin über eine Art Aminosäure-Aufnahmesystem transportieren kann, wächst sie auf Taurin als einziger N-Quelle im Kulturmedium nicht (Tab.22).

Auch andere primären Amine und Aminverbindungen (Äthylamin, Äthanolamin, β -Ala, 2-Aminoacetaldehyd) unterstützten das Wachstum als N-Quelle nicht (Tab.22). Erst auf α -Aminosäuren (Gly, Ala) zeigte Chlorella fusca gutes Wachstum, bestimmt über den Chlorophyllgehalt/Kultur bzw. die Gesamtzellzahl.

Tab.22: Wachstum auf Taurin/anderen N-Verbindungen als einziger N-Quelle

N-Quelle	mg Chlorophyll Kultur	Zellzahl Kultur
Nitratkontrolle (SL-1 Medium)	8.2	28.0×10^8
N-Mangel-Kontrolle	0.03	1.6×10^8
Taurin $\text{SO}_3\text{H}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$	0.04	1.9×10^8
Taurin (-Sulfat)	0.03	1.75×10^8
Äthylamin $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{NH}_2$	0.02	1.1×10^8
Äthanolamin $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$	0.03	1.45×10^8
2-Aminoacetaldehyd $\text{OHC}-\text{CH}_2-\text{NH}_2$	0.04	1.5×10^8
Glycin $\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{NH}_2$	11.0	60.5×10^8
β -Alanin $\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$	0.03	1.5×10^8
Alanin $\text{HOOC}-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CH}_3$	9.8	54.5×10^8

Nach 7 Tagen Wachstum auf den entsprechenden N-Quellen (7.25 mM Konzentration) wurden die Algen geerntet und auf Chlorophyllgehalt/Kultur (2.4.1) und Zellzahl (2.1.3) untersucht. Die (bei Bedarf neutralisierten) N-Quellen wurden sterilfiltriert in die autoklavierten N-freien SL-1 Medien zugegeben.

6.3 Zusammenfassung: Die Taurinaufnahme in Chlorella fusca

Die Alge Chlorella fusca 211-8 .nn Taurin (2-Aminoäthansulfonsäure) auf zwei verschiedene Arten aufnehmen:

1.) Aufnahme unter Sulfat/Schwefel-Mangelbedingungen

Dieser Aufnahme-prozeß besaß einen Km-Wert von 55 μM , ein pH-Optimum bei pH 7.8 und Substratspezifität für Sulfonsäuren. Aminosäuren beeinflussten dagegen die Taurinaufnahme nicht. Analog zur ÄSS-Aufnahme war auch die Empfindlichkeit gegenüber gewissen metabolischen Inhibitoren.

Die Ausbildung des Aufnahmesystems erfolgte gleichzeitig mit der Entwicklung des "ÄSS-Aufnahmesystems" nach Umsetzung auf S-Mangelmedium (lag-Phase 2.5 Stunden). ÄSS- und Taurinaufnahme traten unter diesen Bedingungen immer gekoppelt auf.

2.) Aufnahme unter Nitrat/Stickstoff-Mangelbedingungen

Dieser Aufnahmemodus besaß einen Km-Wert von 1.1 mM, ein pH-Optimum bei pH 4.8 und Substratspezifität für Aminosäuren. Sulfonsäuren hemmten dagegen die Taurinaufnahme nicht. Die Ausbildung des Aufnahmesystems erfolgte nach einer lag-Phase von mehr als 8 Stunden nach Umsetzung auf N-Mangelmedium. (ÄSS-Aufnahme konnte nicht nachgewiesen werden).

Anzeichen für ein (konstitutives) eigenständiges Taurin-Aufnahmesystem wurden dagegen nicht gefunden (Möglichkeit 3).

6.4 ANHANG: Taurinaufnahme in ausgewählte photosynthetische Organismen

Wie in 4.1.2 gezeigt, sind außer Chlorella fusca zahlreiche photosynthetische Organismen zur Taurinaufnahme befähigt (Tab.7). Stellvertretend für diese Gruppe wurden zwei Organismen ausgewählt und genauer untersucht: Die Blaualge Anabaena variabilis (Teil A) und die höhere Pflanze Lemna minor (Teil B).

A) Taurinaufnahme in Anabaena variabilis

Die **Substratspezifität** der Taurinaufnahme wurde durch Wettbewerbsversuche und den 10-fachen Einsatz der unmarkierten Strukturanaloga bestimmt (Abb.34).

a) Sulfonsäuren (Abb.34A)

Alle getesteten Sulfonsäuren beeinflussten die Taurinaufnahme in Taurinkulturen, so daß die Anwesenheit einer Sulfonsäuregruppe im Molekül auch hier strukturelle Voraussetzung für Erkennung/Aufnahme darstellen sollte (siehe Chlorella fusca).

b) Aminosäuren, Aminoäthylsulfat, Sulfat

Aminosäuren (Gly, Ala, β -Alanin) zeigten ebenso wie Aminoäthylsulfat und Sulfat praktisch keinen Hemmeffekt auf die Taurinaufnahme.

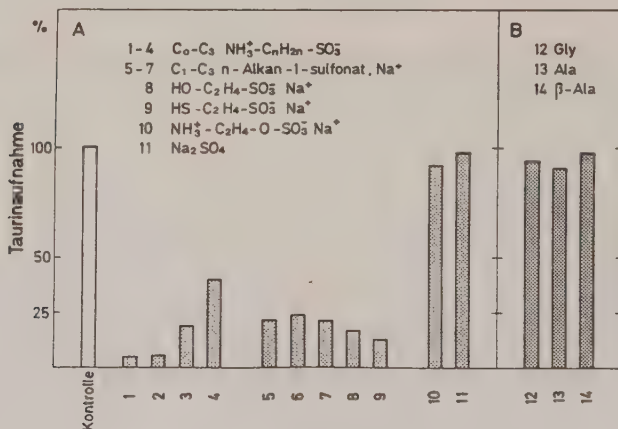


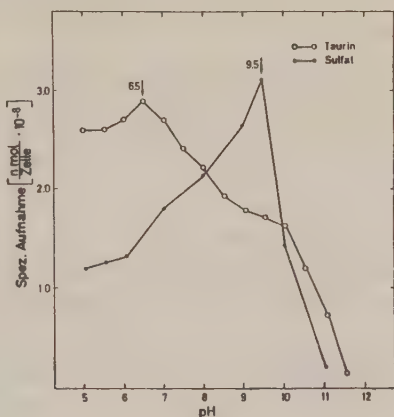
Abb.34: Spezifität der Taurinaufnahme in Anabaena variabilis

Tauringewachsene Kulturen wurden am 5.Tag geerntet, mehrmals mit S-freiem BG-11 Medium gewaschen und für 3-5 Minuten in der zu testenden unmarkierten 3 mM Verbindung vorinkubiert. Alle Verbindungen lagen neutralisiert und in Form ihrer Na-Salze vor. Die Inkubationsdauer betrug 30 Minuten. Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.9.

Das pH-Optimum der Taurinaufnahme in *Anabaena variabilis* lag bei pH 6.5 (Abb.35), deutlich verschieden von dem pH-Optimum der Sulfataufnahme bei pH 9.5.

Abb.35: pH-Abhängigkeit der Taurin/Sulfataufnahme in *Anabaena variabilis*

Taurin/sulfatgewachsene Algen wurden am 5.Tag geerntet, mehrmals mit S-freiem BG-11 Medium gewaschen und für 3-5 Minuten in 0.01 M Kalium-Phosphat-Puffer, pH 5-11.5 vorinkubiert. Anschließend wurde die Taurin/Sulfataufnahme wie üblich bestimmt. Die Inkubationsdauer betrug 30 Min. Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.9 .



Tab.23 zeigt die Unabhängigkeit der Taurinaufnahme von der Konzentration an Na^+ im Aufnahmetest: Taurinaufnahme fand auch in Abwesenheit von Na^+ -Ionen statt und wurde andererseits durch erhöhte Na^+ -Konzentrationen nicht gefördert (Phosphat zeigte dagegen die gleiche Aufnahmestimulierung wie in *Chlorella fusca*).

Zusammenfassend wurde damit eine ziemliche Ähnlichkeit des Taurinaufnahmesystems in *Anabaena variabilis* mit dem System bei *Chlorella fusca* ("S-Mangel") festgestellt, wobei ersteres allerdings zwischen Sulfonsäuren/Sulfatestern diskriminieren kann.

Tab.23: Beeinflussung der Taurinaufnahme in *Anabaena variabilis* durch Variation der vorgegebenen Na^+ -Konzentration

Na^+ -Konzentration	Taurinaufnahme
BG-11 Medium (18,5 mM Na^+)	100 %
$\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer	
-.-	165 %
0.1 mM NaCl	172 %
1 mM NaCl	170 %
10 mM NaCl	175 %

Tauringewachsene Algen wurden nach 3-5 Minuten Vorinkubation in Puffersystemen der angegebenen Zusammensetzung mit 0.3 mM ^{35}S -Taurin versetzt. Inkubationsdauer 30 Minuten. Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.9 und 35.

B) Taurinaufnahme in Lemna minor

Wie in 4.1.2 ausgeführt, fand sich Taurinaufnahme auch nach Kultivation im normalen Aufzuchtmedium bei ausreichender S/N-Versorgung (Tab.7), während bei S-Limitierung die Aufnahmeraten absanken. Dies war ungewöhnlich und stand im Gegensatz zu den Ergebnissen bei Chlorella fusca und Anabaena variabilis. Gleichzeitig konnte ASS weder aufgenommen noch als S-Quelle genutzt werden, so daß die Vermutung nahelag, daß Taurin von der Pflanze als β -Aminosäure erkannt/aufgenommen wird (konstitutiv).

Die Untersuchungen zu Substratspezifität und pH-Optimum der Taurinaufnahme wurden an Sulfatpflanzen durchgeführt, da Taurinzugabe ins Medium starke Wachstumshemmung bewirkte. Die Spezifität wurde wie üblich über Wettbewerbsversuche bestimmt und ist in Abb.36 graphisch zusammengestellt.

a) Sulfonsäuren (Abb.36A)

Mit Ausnahme der Homologa beeinflussten keine der getesteten Sulfonate die Aufnahme. Auch Aminoäthylsulfat und Sulfat zeigten keine Aufnahmehemmung.

b) Aminosäuren und andere Aminoverbindungen (Abb.36B)

Viele der getesteten Aminosäuren (Gly, Ala, Val, Leu, Pro, Phe, Ser, Thr, Met, Arg, His, Gln, Asn und β -Alanin) hemmten die Taurinaufnahme zu 80-90 %. Äthanolamin und NH_4Cl zeigten dagegen nur geringen Einfluß auf die Transportprozeße.

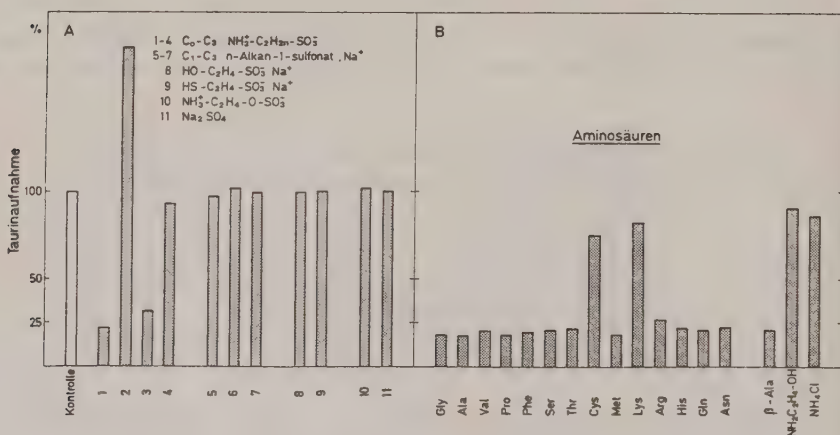


Abb.36: Spezifität der Taurinaufnahme in Lemna minor

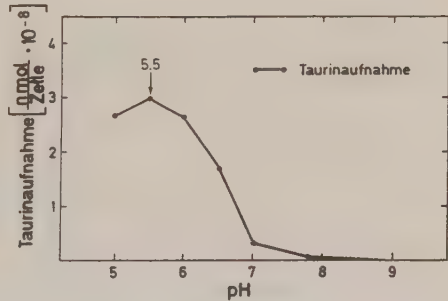
Sulfatgewachsene Blättchen wurden nach dem Waschen für 3-5 Minuten in der zu testenden unmarkierten 4 mM Verbindung vorinkubiert. Danach wurden die Blättchen mit 0,4 mM carrierhaltigem ^{35}S -Taurin versetzt. Alle Verbindungen lagen neutralisiert und in Form ihrer Na-Salze vor. Die Inkubationsdauer betrug 60 Minuten. Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.9.

Das pH-Optimum der Taurinaufnahme in Lemna minor lag bei pH 5.5 (Abb.37).
(siehe auch Abb.36: "Förderung" der Taurinaufnahme durch Aminomethansulfonsäure als einen versteckten pH-Effekt infolge Absenkung des pHs im Aufnahmetest).

Anmerkung: Das Taurinaufnahmesystem in Lemna minor zeigte insgesamt gesehen gewisse Ähnlichkeiten mit dem unter N-Mangel ausgebildeten Transportsystem in Chlorella fusca (6.2).

Abb.37: pH-Abhängigkeit der
Taurinaufnahme in
Lemna minor L.

Sulfatgewachsene Blättchen wurden nach dem Waschen für 3-5 Minuten in 0.01 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, pH 5.0-9.0 vorinkubiert und danach mit 0.4 μM ^{35}S -Taurin versetzt. Inkubationsdauer 60 Minuten. Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.9 .



7. Beschreibung der ÄSS/Taurin-Metabolisierung in Chlorella fusca

Wie bisher gezeigt, vermag Chlorella fusca 211-8b unter gewissen Mangelzuständen auch Sulfonsäuren in die Zelle aufzunehmen.

Vorversuche ließen bald erkennen, daß die aufgenommenen Sulfonsäuren in der Zelle rasch **metabolisiert** werden und die $^{35}\text{S}/^3\text{H}$ -Markierung in verschiedenen Metaboliten wiedergefunden werden konnte. Die daraufhin initiierte Untersuchung des Abbaus $^{35}\text{S}/^3\text{H}$ -markierter Sulfonsäuren nach 1-60 minütiger Inkubation im WARBURG-Apparat ermöglichte die Klärung folgender Punkte:

- 1- Identifikation der metabolischen Folgeprodukte
- 2- Identifikation der frühen Abbauprodukte
- 3- Festlegung des Reaktionsmechanismus

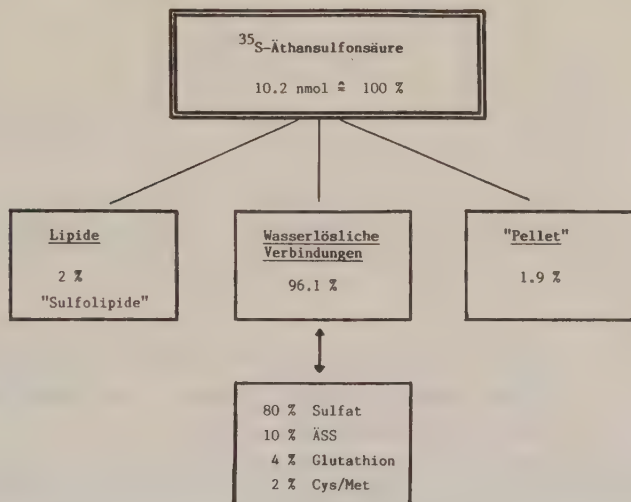
Die erzielten Ergebnisse zeigten ferner auf, inwieweit der Sulfonatschwefel nach Spaltung der C-S Bindung in die üblichen Kanäle des S-Stoffwechsels eingeschleust und zur adequaten Deckung des S-Bedarfs herangezogen werden kann.

7.1 Abbau von ^{35}S -markierter Äthansulfonsäure in Chlorella fusca

Nach einstündiger Inkubation gewaschener ÄSS-Kulturen in 0.3 mM ^{35}S -ÄSS erfolgten Extraktion und Analyse der radioaktiven Produkte in der Zelle wie in Material und Methoden beschrieben (2.8.1). Die einzelnen ^{35}S -Verbindungen wurden zumeist nach DC/DE-Auftrennung charakterisiert, eluiert und quantifiziert. Die Verwendung der CONWAY-Technik (2.8.2) sollte darüber hinaus den Nachweis flüchtiger markierter Verbindungen in der Zelle ermöglichen.

Tab.24 zeigt die Verteilung der aufgenommenen Radioaktivität in Chlorella fusca: Mehr als 96 % der Radioaktivität lag in wasserlöslicher Form vor, 2 % war in der Chloroform/Methanol-Fraktion gelöst (wurde später als Sulfolipide identifiziert), weniger als 2 % blieben ungelöst zurück.

Tab.24: Identifikation und erste Bilanzierung der aufgenommenen Radioaktivität nach Inkubation mit ^{35}S -markierter Äthansulfonsäure



Die gewaschenen ÄSS-Kulturen wurden für eine Stunde in 0.3 mM ^{35}S -ÄSS einer spezifischen Radioaktivität von 650 000 Bq/nmol inkubiert. Die aufgenommene Radioaktivität wurde danach wie in Material und Methoden beschrieben isoliert und analysiert (2.8). Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.9, 38 und 39.

7.1.1 Identifikation der wasserlöslichen ^{35}S -Verbindungen

Die wasserlösliche Radioaktivität wurde wie in 2.8.1 beschrieben halbiert und einer chromatographischen/elektrophoretischen Analyse unterzogen (2.5.1-2.5.2).

Abb.38A zeigt ein repräsentatives **Chromatogramm** nach qualitativer und quantitativer Auswertung (die radioaktiven Gebiete wurden durch Co-chromatographie mit bekannten Standards identifiziert, eluiert und im Szintillationszähler ausgezählt).

Aus dieser Abbildung geht eindeutig hervor, daß die **Mehrheit** der aufgetragenen Radioaktivität nicht mehr mit dem ^{35}S -ÄSS Standard co-chromatographierte und nur ein relativ kleiner Aktivitätspeak in der Position des ÄSS-Standards ($R_f = 0.55$) nachgewiesen werden konnte. - Der Hauptteil der extrahierbaren, wasserlöslichen Radioaktivität lag somit nicht mehr in ursprünglicher Form als ^{35}S -Äthansulfonat vor sondern als davon abgeleitete und andersartige S-haltige Verbindung ($R_f \approx 0$).

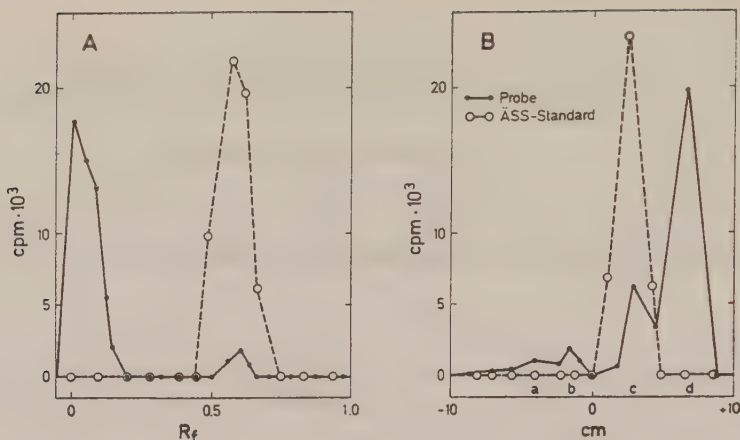


Abb.38: Chromatographische (A) und elektrophoretische (B) Analyse der wasserlöslichen Radioaktivität nach einstündiger Inkubation mit ^{35}S -markierter Äthansulfonsäure

Die wasserlösliche Fraktion wurde nach Inkubation 5 Tage alter ÄSS-Kulturen in $0.3 \text{ mM } ^{35}\text{S}$ -ÄSS (Inkubationsdauer 60 Minuten) wie in Material und Methoden beschrieben isoliert und analysiert (2.8). Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.9 .

System A: DC (Lösungsmittel i-Propanol : NH_3 : H_2O = 20 : 1 : 4)

System B: DE (Lösungsmittel 0.1 M Citratpuffer, pH 5.8 bei 25 V/cm und 14 °C für 30-40 Minuten)

Dieses Versuchsergebnis wurde durch Dünnschicht-Elektrophorese (Abb.38B, rechts) der zweiten Probenhälfte bestätigt. Auch in diesem System wanderte die Mehrheit der Radioaktivität (d) nicht mit dem ÄSS-Standard (c) sondern lief deutlich schneller als das einfach negativ geladene Äthansulfonation in Richtung Anode.

Nur ein kleiner Teil der Aktivität (c) co-elektrophoresierte mit authentischer Äthansulfonsäure, zwei andere kleinere cpm-Maxima des DE-Systems verhielten sich wie Glutathion (b) und Cyst(e)in/Methionin (a). Der Hauptpeak (d) jedoch, der 80 % der aufgenommenen Radioaktivität enthielt, konnte als Sulfat identifiziert werden (siehe auch Abb.43).

7.1.2 Identifikation der chloroform-löslichen ^{35}S -Verbindungen

Die nicht-wasserlösliche Radioaktivität wurde wie in 2.8.1/2.5.1 beschrieben einer chromatographischen Analyse auf DC-Fertigplatten unterzogen.

Abb.39 zeigt das Chromatogramm nach zweimaligem Lauf.

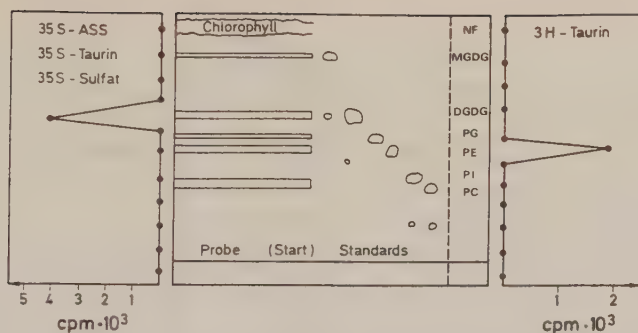


Abb.34: Chromatographische Analyse der chloroform/methanol-löslichen Radioaktivität nach Inkubation mit $^{35}\text{S}/^3\text{H}$ - ÄSS/Taurin/Sulfat

Chlorella fusca wurde 5 Tage auf 0.3 mM ÄSS/Taurin/Sulfat kultiviert und nach Waschen mit S-freiem SL-1 Medium für eine Stunde in der $^{35}\text{S}/^3\text{H}$ -markierten Schwefelquelle (ÄSS/Taurin/Sulfat) inkubiert. Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.9. Die chloroform/methanol-lösliche Radioaktivität wurde anschließend wie in Material und Methoden beschrieben (2.8) isoliert und analysiert. (Abkürzungen wie ursprünglich definiert).

DC: Lösungsmittel Aceton: Benzol : H_2O = 91 : 30 : 8

Das Chromatogramm enthielt eine einzige ^{35}S -markierte Bande, die in etwa die gleichen Rf-Werte wie DGDG (Digalactosyldiglycerin) aufweist. Diese Markierung war in allen Versuchen mit ^{35}S -Verbindungen (ÄSS/Taurin/Sulfat) wiederzufinden und wurde aufgrund ihres Rf-Wertes als **Sulfolipide** identifiziert (persönliche Informationen Henkelmann, Dr.Senser).

7.1.3 Nachweis flüchtiger ^{35}S -markierter Verbindungen

Mit Hilfe der Conway-Technik sollten gezielt ^{35}S -markierte flüchtige Verbindungen wie Sulfit, Sulfid oder Mercaptane nachgewiesen werden (2.8.2).

a) Äthylmercaptan: Trotz überdurchschnittlich hoher Markierung der eingesetzten ^{35}S -Äthansulfonsäure konnte in den Algen keine an CuCl adsorbierbare ^{35}S -Aktivität nachgewiesen werden.

b) Sulfit/Sulfid: Selbst als die inkubierten Proben direkt und ohne Zeitverlust (Waschen, etc.) in die Conway-Schälchen überführt wurden, konnte in den Algen praktisch keine säurelabile Radioaktivität nachgewiesen werden.

Abschließend sollte man erwähnen, daß die beschriebenen Metabolisierungsversuche in erster Linie mit ÄSS-gewachsenen Algen durchgeführt wurden. Ein Kontrollversuch mit Taurinkulturen ergab jedoch identische Versuchsergebnisse bezogen auf Tab.24 und Punkt 7.1.1-7.1.2 .

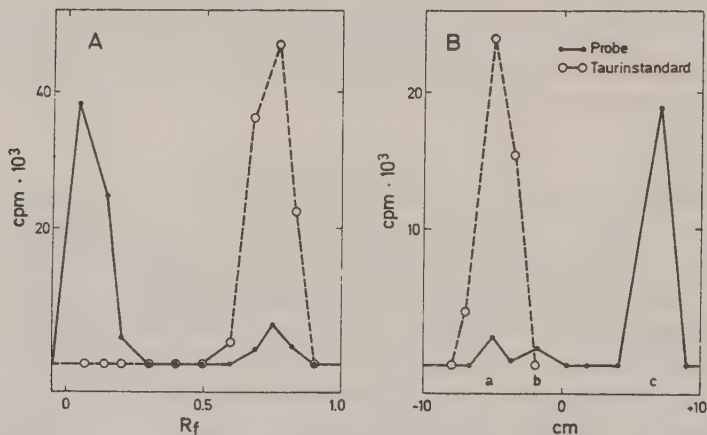
7.2 Abbau von ^{35}S -markiertem Taurin in *Chlorella fusca*

Im Anschluß an die 60-minütige Inkubation gewaschener Taurinkulturen in 0.3 mM ^{35}S -Taurin wurde die aufgenommene und eingebaute Radioaktivität wie in Material und Methoden beschrieben extrahiert und analysiert (2.8).

Tab.25 zeigt die Verteilung der aufgenommenen Radioaktivität in *Chlorella fusca* (rechts): In Analogie zur ^{35}S -ÄSS-Metabolisierung lag auch hier 96 % der Aktivität in wasserlöslicher Form vor, 2 % war in der Chloroform/Methanol-Fraktion gelöst und etwas weniger als 2 % blieben ungelöst zurück.

7.2.1 Identifikation der wasserlöslichen ^{35}S -Verbindungen

Die wasserlösliche Radioaktivität wurde aufgeteilt und einer chromatographischen bzw. elektrophoretischen Analyse unterzogen. Abb.40A/B zeigt je ein repräsentatives Chromatogramm/Elektropherogramm der radioaktiven Produkte in der Zelle.



Tab.40: Chromatographische (A) und elektrophoretische (B) Analyse der wasserlöslichen Radioaktivität nach einstündiger Inkubation mit ^{35}S -markiertem Taurin

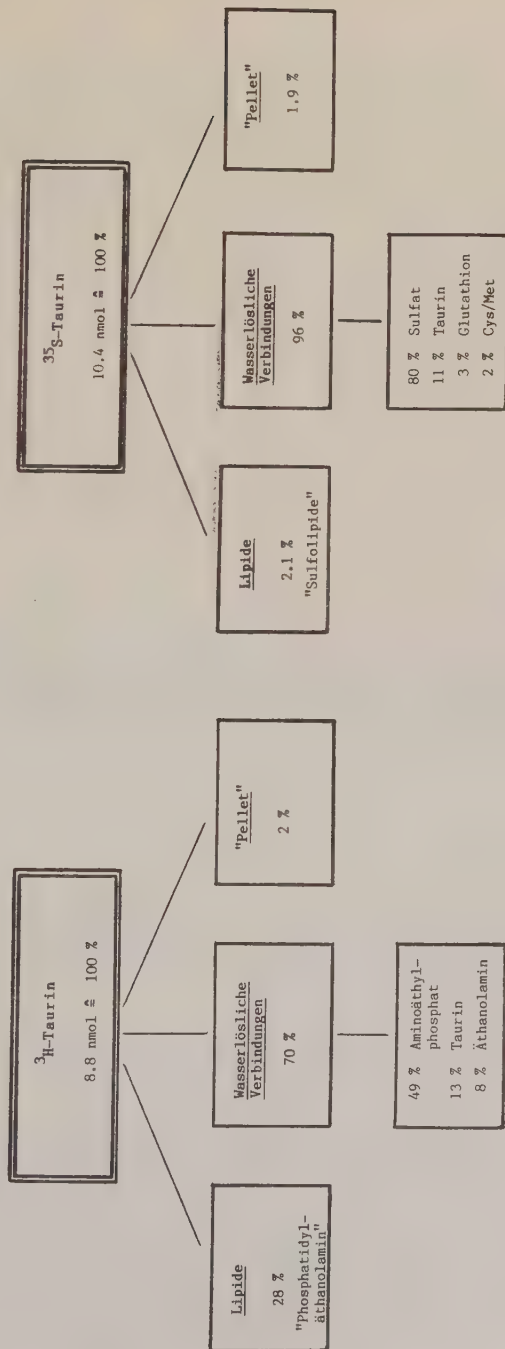
Die wasserlösliche Radioaktivität wurde nach Inkubation 5 Tage alter Taurinkulturen in 0.3 mM ^{35}S -Taurin (Inkubationsdauer 60 Minuten) wie in Material und Methoden beschrieben isoliert und analysiert (2.8). Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.9 .

System A: DC (Lösungsmittel i-Propanol : NH_3 : H_2O = 20 : 1 : 4)

System B: DE (Lösungsmittel 0.1 M Citratpuffer, pH 5.8 bei 25 V/cm und 14 °C für 30-40 Minuten)

Tab.25:

Identifikation und erste Bilanzierung der aufgenommenen Radioaktivität nach Inkubation mit ^{35}S -Taurin



Die gewaschenen Taurinkulturen wurden für eine Stunde in $0.3 \text{ mM } ^{35}\text{S}$ -Taurin/ ^3H -Taurin einer spezifischen Radioaktivität von mehr als $650\,000 \text{ Bq/nmol}$ inkubiert. Die aufgenommene und eingebaute Radioaktivität wurde danach wie in Material und Methoden beschrieben isoliert und analysiert (2.8). Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb. 9, 39, 40 und 41.

In beiden Systemen wanderte die **Mehrheit** der aufgenommenen Radioaktivität nicht mit dem vorgegebenen ^{35}S -Taurinstandard, nur ein kleiner Teil der Gesamtaktivität konnte jeweils in der Position des Taurinstandards nachgewiesen werden (a). Ein weiteres kleineres cpm-Maximum des DE-Systems verhielt sich wie Glutathion (b), während die Aminosäuren Cyst(e)in und Methionin sehr ähnliches Laufverhalten wie Taurin zeigten und erst bei einem nachfolgenden DE-Lauf über längere Strecken/Zeiten aufgetrennt werden konnten. Der Hauptpeak (c) mit 80 % der wasserlöslichen Aktivität wurde wiederum als **Sulfat** identifiziert (7.1.1) und wies damit auf ein gleichartiges Abbauprinzip/Reaktionsmechanismus von ÄSS und Taurin.

Die Bildung von Cysteamin konnte dagegen so gut wie ausgeschlossen werden, da in einem zweiten DE-System (Essigsäure/~~Amisensäure~~ pH 2) keine radioaktiv markierten Substanzen in der Position des Cysteaminstandards nachzuweisen waren.

7.2.2 Identifikation der chloroform-löslichen ^{35}S -Verbindungen

Die DC-Auftrennung der Chloroform/Methanol-löslichen Radioaktivität ergab dasselbe Muster wie im Falle der ÄSS -Metabolisierung (Abb.39): Die einzige ^{35}S -markierte Lipidbande chromatographierte gleichermaßen wie DGDG (Sulfolipid).

7.3 Abbau von ^3H -markiertem Taurin in *Chlorella fusca*

Mit Hilfe ^3H -markiertem Taurins sollte das weitere Schicksal des bei der Spaltung der C-S Bindung entstehenden C-Restes gezielt untersucht werden (^3H -Taurin war im Gegensatz zu ^3H -markierter ÄSS käuflich zu erwerben und wurde daher für diesen Versuch vorgezogen).

Im Anschluß an die 60-minütige Inkubation gewaschener Taurinkulturen in 0.3 mM ^3H -Taurin wurde die gesamte aufgenommene und eingebaute ^3H -Radioaktivität wie in Material und Methoden beschrieben weiter untersucht (2.8).

Tab.25 zeigt die Verteilung der aufgenommenen Radioaktivität in *Chlorella fusca* (links): 70 % der Gesamtaktivität gingen in die wasserlösliche Fraktion über, 28 % der Aktivität lagen in der Chloroform/Methanol-Fraktion vor, 2 % blieben ungelöst. (Auffallend: Der ^3H -Lipidanteil lag deutlich höher als der Prozentsatz an ^{35}S -Lipiden nach ^{35}S -Taurinfütterung).

7.3.1 Identifikation der wasserlöslichen ^3H -Verbindungen

Die wasserlösliche ^3H -Radioaktivität wurde einer DC/DE-Auftrennung unterworfen.

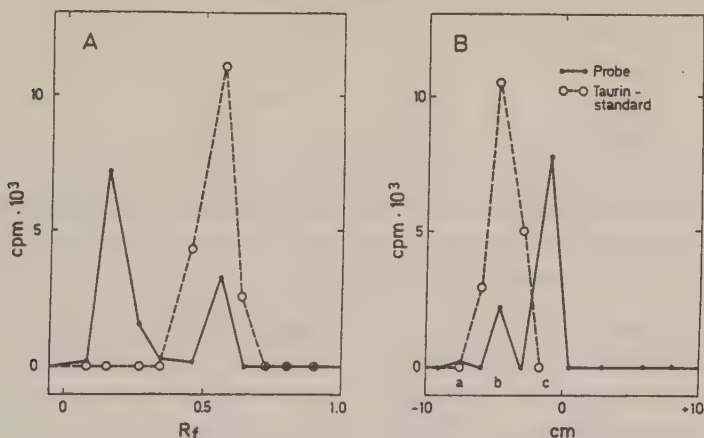


Abb.41: Chromatographische (A) und elektrophoretische (B) Analyse der wasserlöslichen Radioaktivität nach Inkubation mit ^3H -Taurin

Die wasserlösliche Radioaktivität wurde nach Inkubation 5 Tage alter Taurinkulturen in $0.3 \text{ mM } ^3\text{H}$ -Taurin (Inkubationsdauer 60 Minuten) wie in Material und Methoden beschrieben isoliert und analysiert (2.8). Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.9.

System A: DC (Lösungsmittel 1-Propanol : NH_3 : H_2O = 6 : 3 : 1)

System B: DE (Lösungsmittel 0.1 M Citratpuffer, pH 5.8 bei 25 V/cm und 14 °C für 30-40 Minuten)

Sowohl Chromatogramm (Abb.41A) wie Elektropherogramm (Abb.41B) zeigten, daß die Mehrheit der aufgetragenen ^3H -Radioaktivität nicht mehr mit dem Taurinstandard wanderte, obwohl ein kleinerer Aktivitätspeak in der Position des ^{35}S -Standards aufgefunden werden konnte (b). Ein weiteres cpm-Maximum des DE-Systems verhielt sich wie Äthanolamin (a); der Hauptteil der Aktivität (c) konnte jedoch aufgrund seines Laufverhaltens im DC/DE-System als Aminoäthylphosphat identifiziert werden.

7.3.2 Identifikation der chloroform-löslichen ^3H -Verbindungen

Die DC-Analyse der Chloroform/Methanol-Fraktion wurde analog zur Auftrennung der ^{35}S -Lipide durchgeführt (7.1.2). Abb.38 zeigt im rechten Teil des Chromatogramms die Verteilung der ^3H -Aktivität nach zweimaligem Lauf - auch in diesem Ansatz war die gesamte Radioaktivität in einer einzigen Lipidbande konzentriert, die diesmal die gleichen R_f -Werte wie Phosphatidyläthanolamin (PE) aufwies.

7.3.3 Nachweis flüchtiger ^3H -markierter Verbindungen

Mit Hilfe der Conway-Technik (2.8.2) wurden erhebliche Anteile an überdestillierbarer ^3H -Radioaktivität auf Aminbasis (Äthanolamin ?) festgestellt.

7.4 Kurzzeitanalysen der Sulfonsäure-Metabolisierung

Im Anschluß an die Kurzzeitinkubation (0.5-1-2 Minuten) von ÄSS/Taurinkulturen in $^{35}\text{S}/^3\text{H}$ -markierten Sulfonsäuren wurden die Zellen gezielt auf die Anwesenheit früher radioaktiver Abbauprodukte untersucht.

^{35}S -Sulfat: Bereits 0.5 Minuten nach Inkubation in ÄSS/Taurin konnte ^{35}S -Sulfat dünn-schichtchromatographisch nachgewiesen werden (etwa 3 % der Gesamtaktivität). Dieser Anteil stieg nach 1 Minute auf 5 % und nach 2 Minuten auf über 7 % an. Die Bildung von Sulfat scheint damit einer der ersten Schritte in der Degradation von Sulfonsäuren darzustellen: Sulfatbildung als katabolischer Prozeß erfolgte mehr oder weniger linear mit der Zeit.

^{35}S -Sulfit/Sulfid und ^{35}S -Mercaptan: Wurden als Kurzzeitprodukte nicht gefunden.

^3H -Amine: Nach Inkubation in ^3H -Taurin konnten bereits 0.5 Minuten später mit Hilfe der Conway-Technik ^3H -markierte Amine (Äthanolamin ?) nachgewiesen werden. Tab.26 zeigt den Anstieg an überdestillierbarer ^3H -Radioaktivität auf Aminbasis während der ersten Minuten nach Inkubation mit ^3H -Taurin.

Tab.26: Bildung ^3H -markierter Amine in den ersten Minuten der Inkubation mit ^3H -Taurin

Inkubationszeit (Minuten)	cpm/Conway-Ansatz
t = 0.5	978
t = 1	1679
t = 2	2476

Gewaschene Kulturen wurden für 0.5/1/2 Minuten in 0.3 mM ^3H -Taurin inkubiert und danach wie in Material und Methoden beschrieben (2.8.2) äußerst schnell in CONWAY-Schälchen überführt und bezüglich der Menge an ^3H -Radioaktivität auf Aminbasis untersucht.

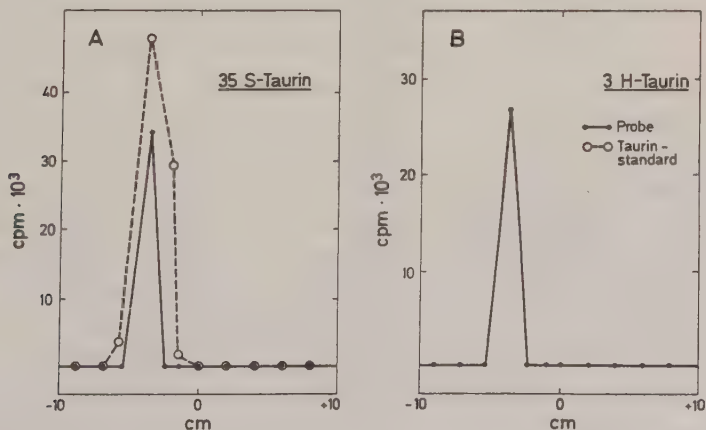
7.5 Abbau von ÄSS/Taurin in S-Mangelkulturen von Chlorella fusca

Nach 5-tägiger Kultivierung auf S-Mangelmedium wurde Chlorella fusca wie üblich in den Aufnahmetest eingesetzt und auf markierte Zellbestandteile untersucht. Tab.27 zeigt vergleichend die Verteilung der Radioaktivität nach einstündiger Inkubation in 0,3 mM $^{35}\text{S}/^3\text{H}$ -markiertem Taurin/ÄSS und ^{35}S -Sulfat.

Im Gegensatz zu den bisherigen Ergebnissen (7.1 - 7.3) war bei S-Mangelkulturen der Anteil an wasserlöslicher Radioaktivität noch stärker erhöht. Vor allem der bei Taurinkulturen so hohe Gehalt an ^3H -Radioaktivität in der Lipoidfraktion konnte bei S-Mangelkulturen nicht reproduziert werden. Allerdings fächerte sich die wasserlösliche Radioaktivität in die bereits bekannten $^{35}\text{S}/^3\text{H}$ -markierten Metabolisierungsprodukte auf, so daß in S-Mangelalgen zumindestens Primärprozesse des Sulfonsäureabbaus stattfinden sollten.

7.6 Taurinabbau in N/30-Mangelkulturen von Chlorella fusca

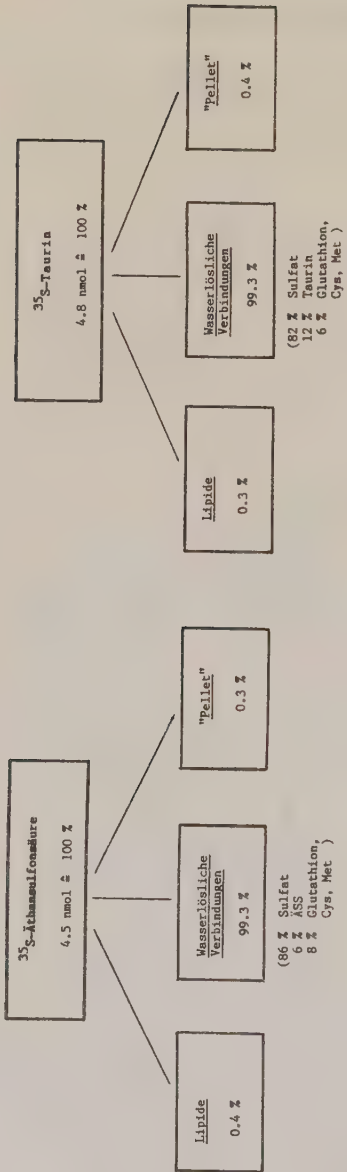
Nach 8-tägiger Kultivierung auf N/30-Mangelmedium wurde Chlorella fusca für eine Stunde im WARBURG mit $^{35}\text{S}/^3\text{H}$ -Taurin inkubiert und auf markierte Zellbestandteile untersucht (2.8).



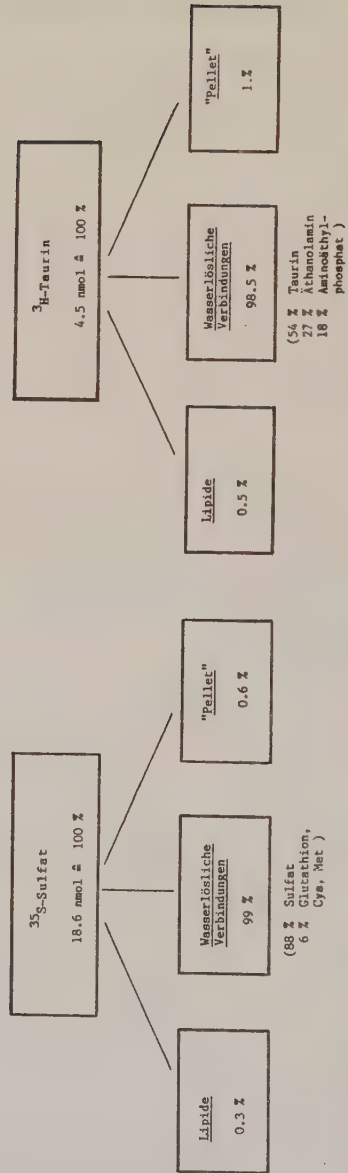
Tab.42: DE-Analyse der wasserlöslichen Radioaktivität nach Inkubation von N/30-Mangelalgen in markiertem Taurin

Die wasserlösliche Radioaktivität wurde nach Inkubation 8 Tage alter N/30-Mangelkulturen in 0,3 mM $^{35}\text{S}/^3\text{H}$ -Taurin (Inkubationsdauer 60 Minuten) wie in Material und Methoden beschrieben isoliert und analysiert (2.8). Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.9 und 30.

DE: Lösungsmittel 0,1 M Citratpuffer, pH 5,8 bei 25 V/cm und 14 °C für 30-40 Minuten



Tab.27: Identifikation und erste Bilanzierung der in S-Mangelalgen aufgenommenen Radioaktivität nach Inkubation mit $^{35}\text{S}/^3\text{H}$ -markiertem ASS/Tyrosin/Sulfat



Die gewaschenen S-Mangelkulturen wurden für eine Stunde in der 0,3 m hochspezifisch markierten $^{35}\text{S}/^3\text{H}$ -Schwefelquelle (ASS, Tyrosin, Sulfat) inkubiert. Die aufgenommene Radioaktivität wurde danach wie in Material und Methoden beschrieben isoliert und analysiert. Weitere Verbrauchbedingungen siehe Abb.9, 37-41, 43.

Abb.42 zeigt exemplarisch zwei Elektropherogramme, auf denen die extrahierbare wasserlösliche Radioaktivität aus N/30-Mangelalgen aufgetragen war: In beiden Fällen wanderte die gesamte Radioaktivität parallel zum ^{35}S -Taurinstandard.

Im Gegensatz zu den bisherigen Untersuchungen lag damit das aufgenommene Taurin auch nach einer Stunde Inkubation noch **unverändert** vor und wurde nicht wie in Taurinkulturen zu anderen Produkten metabolisiert (7.2-7.3).

7.7 Metabolisierung von ^{35}S -Sulfat in *Chlorella fusca* unter verschiedenen Ernährungsbedingungen

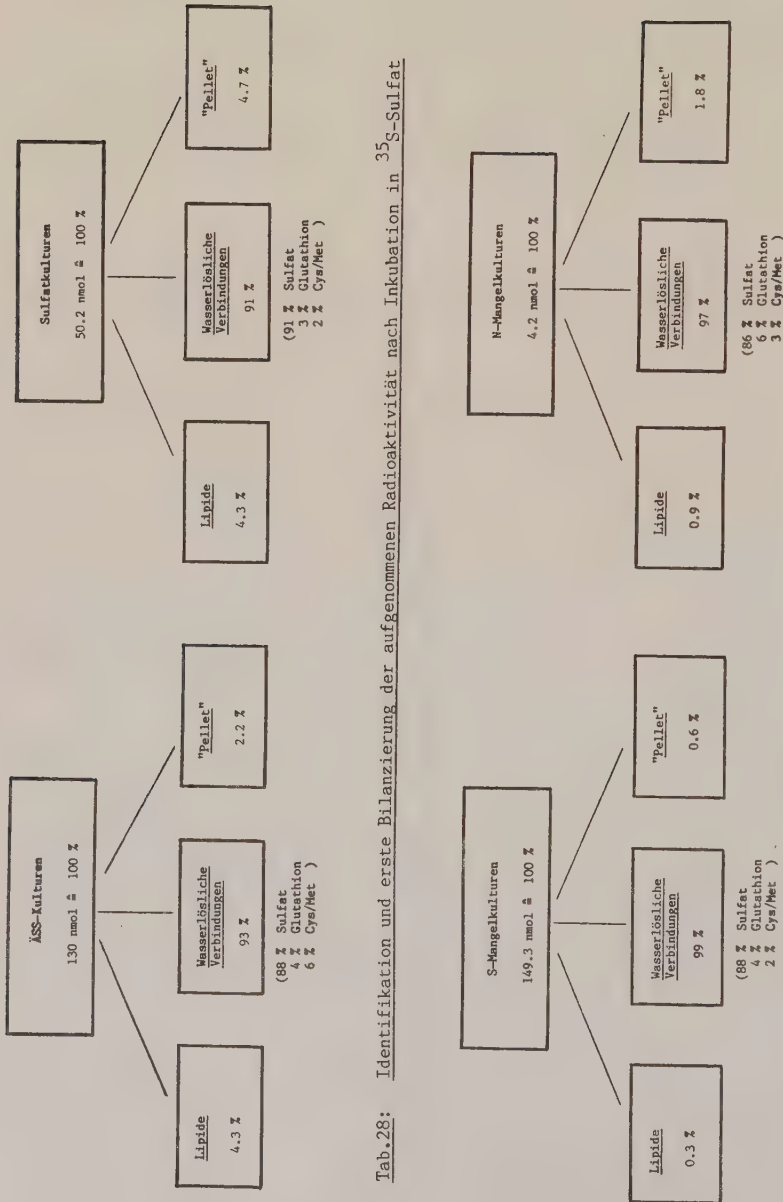
Um die bisher erzielten Versuchsergebnisse zur Metabolisierung $^{35}\text{S}/^3\text{H}$ -markierter Sulfonsäuren besser einschätzen und deuten zu können, wurden analoge Versuche mit ^{35}S -Sulfat als Substrat durchgeführt. Wie in den früheren Fällen beschränkte man sich allerdings auf die Untersuchung einiger weniger und typischer Produkte des S-Stoffwechsels in *Chlorella fusca*. Auf die komplette Bilanzierung S-haltiger zellulärer Bausteine (analog zu 50, 69) wurde verzichtet.

Die Algen wurden 5 Tage unter verschiedenen Bedingungen der S- und N-Ernährung kultiviert (Sulfat, ÄSS , S-Mangel, N-Mangel) und wie üblich in den Aufnahmetest eingesetzt (2.7). Im Anschluß an die einstündige Inkubation in 0.3 mM ^{35}S -Sulfat erfolgte Extraktion und DC/DE-Auftrennung der gebildeten radioaktiven Produkte in der Zelle wie mehrfach beschrieben (2.8/7.1-7.3).

Tab.27 zeigt die Verteilung der aufgenommenen ^{35}S -Radioaktivität in den einzelnen Kulturen *Chlorella fuscas* (vgl. auch Tab.24). Vor allem bei den oben aufgeführten, gut wachsenden Kulturen stimmten die prozentualen Anteile an der Gesamtaktivität und ihre Aufteilung ziemlich gut überein (allerdings lag der Sulfolipidanteil in sulfatinkubierten ÄSS -Algen deutlich höher als bei ÄSS -Inkubation und war an das Sulfatniveau angepaßt). Andererseits zeigten beide Mangelkulturen eine Abnahme der lipid/pelletgebundenen Radioaktivität und ein Überwiegen der wasserlöslichen Aktivität (siehe auch 7.5 - Sulfonsäure-Metabolisierung in S-Mangelalgen).

Abb.42 zeigt je ein typisches **Chromatogramm/Elektropherogramm** der wasserlöslichen Radioaktivität nach Inkubation von Sulfatkulturen in ^{35}S -Sulfat. In beiden Systemen wanderte die Mehrheit der Radioaktivität wie der vorgegebene ^{35}S -Sulfatstandard (c); zwei kleinere cpm-Maxima des DE-Systems verhielten sich dagegen wie Glutathion (b) und Cyst(e)in/Methionin (a) - siehe auch DC-System.

Die DC-Auftrennung der chloroform-löslichen Radioaktivität erfolgte wie in **Abb.38** und ergab nur eine einzige ^{35}S -markierte Lipidbande (Sulfolipide).



Tab.28: Identifikation und erste Bilanzierung der aufgenommenen Radioaktivität nach Inkubation in ^{35}S -Sulfat

Chlorella fusca wurde 5 Tage nach Kultivation auf 0.3 mM iSS/Sulfat bzw. S-Mangelmedium und N-Mangelmedium abgeerntet, gewaschen und für eine Stunde in 0.3 mM ^{35}S -Sulfat hoher spezifischer Radioaktivität inkubiert (650 000 Bq/mol). Die aufgenommene und eingebaute Radioaktivität wurde danach wie in Material und Methoden beschrieben isoliert und analysiert (2.8). Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.9, 38, 39, 42 und 43.

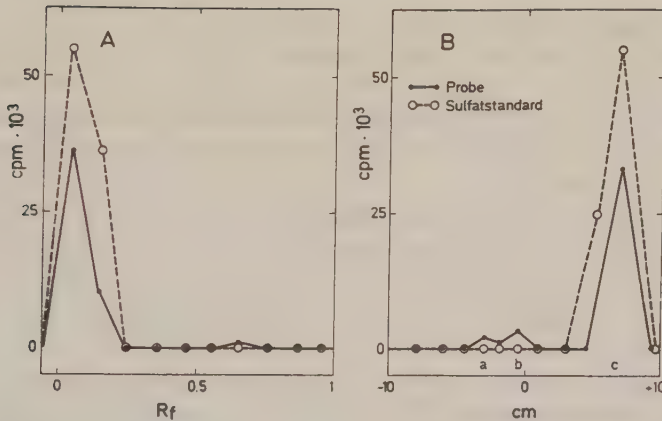


Abb.43: Chromatographische (A) und elektrophoretische (B) Analyse der wasserlöslichen Radioaktivität nach Inkubation in ^{35}S -Sulfat

Die wasserlösliche Radioaktivität wurde nach Inkubation 5 Tage alter Sulfatkulturen in $0.3 \text{ mM } ^{35}\text{S}$ -Sulfat (Inkubationsdauer 60 Minuten) wie in Material und Methoden beschrieben isoliert und analysiert (2.8). Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.9.

System A: DC (Lösungsmittel 1-Propanol : NH_3 : H_2O = 20 : 1 : 4)

System B: DE (Lösungsmittel 0.1 M Citratpuffer, pH 5.8 bei 25 V/cm und 14 °C für 30-40 Minuten)

7.8 Sulfonsäureabbau im zellfreien System

5 Tage alte Sulfonsäurekulturen von Chlorella fusca wurden wie in Material und Methoden beschrieben abgeerntet und aufgeschlossen (2.1.2-2.1.4).

Der gewonnene Rohextrakt (RE) wurde neben den pelletierten Membranfraktionen (P) in eine Vielzahl verschiedener Testansätze zur Messung des Sulfonsäureabbaus im zellfreien System eingesetzt. Alle Versuche wurden sowohl mit RE bzw. P allein als auch in der Kombination RE + P durchgeführt.

Als Aufbrech/Reaktionspuffer dienten neben Tris/HCl-Puffer (+10 mM Mercaptoäthanol) auch ein Phosphatpuffer, pH 8.0 – da Trispuffer mehrere enzymatische Reaktionen in Chlorella fusca zu hemmen vermag (z.B. Sulfitoxidation (151) oder membrangebundene Cysteinoxidation (112)).

Trotzdem konnte mit keinem der nun folgenden Versuchsansätze Ergebnisse zum Sulfonsäureabbau im zellfreien System gewonnen werden (z.B. Nachweis gebildeter Reaktionsprodukte).

α -Hydroxylierung (2.6.2)

Dieser Reaktionsmechanismus wurde ursprünglich (182) für die Desulfonierung von n-Alkan-1-sulfonsäuren in Pseudomonasarten beschrieben. Reaktionsprodukte waren Sulfit und der entsprechende Aldehyd. Gleichzeitig verbrauchte das bakterielle Enzym NADH, so daß sich der Reaktionsverlauf am Photometer direkt bei 340 nm verfolgen ließ (siehe 182).

Aber: Extinktionsabnahme bei 340 nm aufgrund spezifischer NADH/NADPH-Oxidationen konnte im Testansatz nicht nachgewiesen werden. Auch entstanden weder Sulfit (2.4.4) noch Carbonylverbindungen (2.4.8) in nachweisbaren Mengen.

Direkte Desulfonierung (2.6.1)

Dieser Reaktionstyp wurde v.a. bei Bakterien (Endprodukte: Sulfit + Alkohol/Phenol) und bei Pilzen (Endprodukte: Sulfat + Alkan/Benzol) beschrieben. Theoretisch können bei dieser Desulfonierung folgende Reaktionsprodukte entstehen (Abb.54) :

- Sulfat, Sulfit, Sulfid und Mercaptane
- Alkane, Alkene und Alkohole

Aber: Trotz Variation zahlreicher Cofaktoren (NADH, NADPH, ATP + $MgCl_2$, DTE, Dithionit + Methylviologen, FMN, Cystein) konnte keines der oben aufgeführten Endprodukte nachgewiesen werden (2.4.4; 2.4.5; 2.4.6; 2.6.3; 2.8.2).

Die Versuchswiederholung mit ^{35}S -markiertem Taurin als Substrat und DE-Analyse der entstandenen markierten Reaktionsprodukte verlief ebenfalls negativ. Im Gegensatz zu den Versuchsergebnissen bei intakten Algenzellen (7.2) war im zellfreien System kein ^{35}S -markiertes Sulfat nachweisbar.

Weitere Versuchsansätze

- Die Inkubation ^{35}S -markierter Äthansulfonsäure mit Reduktionsäquivalenten und anderen Cofaktoren (s.o.) ergab keine überdestillierbare und an $CuCl$ adsorbierbare Radioaktivität auf Mercaptanbasis ("Äthanthiol", 2.8.2).
- Auch der Versuch, ^{35}S -ÄSS/Taurin als Substrate direkt in den Enzymansatz zur Sulfataktivierung einzusetzen, scheiterte (2.6.7). Nach einer Stunde Inkubation mit ÄSS/Taurin war im Gegensatz zu ^{35}S -Sulfat praktisch keine überdestillierbare ^{35}S -Radioaktivität nachweisbar.

7.9 Zusammenfassung: Die Metabolisierung von Äthansulfonsäure und Taurin in Chlorella fusca

Chlorella fusca wurde im WARBURG-Apparat für 0.5-60 Minuten mit $^{35}\text{S}/^3\text{H}$ -markierten Sulfonsäuren ("Substrat") inkubiert, extrahiert und bezüglich der aufgenommenen Radioaktivität untersucht (2.8).

Die folgenden Verbindungen wurden dabei routinemäßig aufgetrennt, identifiziert und quantifiziert:

- Wasserlösliche Radioaktivität: Sulfat, Glutathion, Cyst(e)in, Methionin und die eingesetzten Sulfonsäuren ÄSS/Taurin (bzw. Äthanolamin, Aminoäthylphosphat und Cysteamin)
- Chloroform-lösliche Radioaktivität: Sulfolipide (Phosphatidyläthanolamin)
- Unlösliche Radioaktivität ("Pellet"): vermutlich in Proteinen bzw. an der Zellwand festgelegte Aktivität

Flüchtige ^{35}S -Verbindungen nach Inkubation mit ^{35}S -Sulfonsäuren (Sulfit, Sulfid oder Mercaptan) wurden dagegen nicht entdeckt. Effluxbestimmungen zeigten bereits früher (5.2), daß auch keine bedeutenden Mengen an ^{35}S -Verbindungen ins Medium abgegeben werden.

Folgende wichtige Ergebnisse wurden erzielt:

- 1- Der Hauptteil der wasserlöslichen Radioaktivität lag nach einer Stunde nicht mehr in Form der eingesetzten Sulfonsäure vor sondern als Sulfat (bzw. Aminoäthylphosphat).
- 2- Als frühe Abbauprodukte konnten ^{35}S -Sulfat (^3H -Äthanolamin) bereits 0.5 Minuten nach Zugabe der Sulfonsäuren nachgewiesen werden.
- 3- Diese frühen Abbauprodukte wurden anschließend weiter **metabolisiert**. Neben Sulfat wurden andere markierte Verbindungen des S/C-Stoffwechsels entdeckt: Glutathion, Cyst(e)in, Methionin und Sulfolipide. (Die ^3H -Radioaktivität fand sich ihrerseits in Aminoäthylphosphat und Phosphatidyläthanolamin wieder).
- 4- Als **Reaktionsmechanismus** des Sulfonsäureabbaus in Chlorella fusca ließe sich damit eine Art hydrolytische Spaltung der C-S Bindung postulieren (siehe Diskussion).
- 5- **N-Mangelkulturen** können zwar Taurin über die Aminogruppe in die Zelle aufnehmen (6.3), besitzen aber nicht die Fähigkeit, Taurin im Anschluß daran weiter abzubauen (und als N-Quelle zu nutzen).

7.10 ANHANG: Die Metabolisierung von Äthansulfonsäure in Anabaena variabilis

ÄSS-Kulturen von Anabaena variabilis wurden nach 1 Stunde Inkubation in 0.3 mM ^{35}S -ÄSS wie üblich extrahiert und auf die Anwesenheit radioaktiver Produkte in der Zelle untersucht (2.8).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei Chlorella fusca (siehe 7.1), trat diesmal sehr wenig ^{35}S -Sulfat als Reaktionsprodukt auf (5-10 % der Gesamtaktivität). Dagegen war ein auffallend hoher Anteil flüchtiger ^{35}S -Radioaktivität mit Hilfe der Conway-Technik nachweisbar (2.8.2):

- Mercaptane: Ungefähr 5 % der aufgenommenen ^{35}S -ÄSS Radioaktivität wurde als überdestillierbare und an CuCl -adsorbierbare Aktivität gefunden
- Sulfid: Etwas geringer lag der Anteil an säurelabiler überdestillierbarer und an Zinkacetat adsorbierbare Radioaktivität ("Sulfid")

Aufgrund dieser Versuchsergebnisse ist es möglich anzunehmen, daß die Blaualge Anabaena variabilis ein von Chlorella fusca abweichendes Sulfonsäure-Abbauschema besitzt: Reduktion der aufgenommenen Sulfonsäure und Spaltung der C-S Bindung auf Mercaptanniveau (siehe Diskussion).

8. Regulation von Sulfonsäureaufnahme und anderer enzymatischer Prozeße bei wechselnden Ernährungsbedingungen

In diesem Kapitel soll das Verhalten ausgewählter Enzyme des S- und N-Stoffwechsels bei Änderung der vorliegenden Anzuchtbedingungen aufgezeigt werden.

Ziel der Untersuchungen war u.a. die erfolgreiche Eingliederung der Sulfonsäure-Aufnahmeprozesse (+ nachgeschalteter Metabolisierungsprozesse) in die **Hierarchie des S- und N-Stoffwechsels**. Bestimmt wurde daher die Veränderung des Aufnahmeverhaltens (Sulfonsäure, Sulfat) bei Cyst(e)in- oder Methioninzugabe ins Kulturmedium und die Antwort verschiedener S- und N-verarbeitender Enzyme auf S/N-Mangel:

- | | |
|-------------------------------|------------------------------|
| - Thiosulfatreduktase (2.6.3) | - Glutaminsynthetase (2.6.8) |
| - Cysteinsynthase (2.6.4) | - Nitratreduktase (2.6.9) |
| - Sulfataktivierung (2.6.7) | |

Durch Korrelation dieser Versuchsergebnisse mit den Wachstumsparametern Zellzahl, Protein- und Chlorophyllgehalt wurde auch ein Einblick in die **hochgradige Verzahnung** der S- und N-Stoffwechselwege bei Chlorella fusca ermöglicht.

8.1 Beeinflussung von ÄSS/Taurin/Sulfataufnahme in Chlorella fusca durch Cystein/Methioninzugabe ins Kulturmedium

Die Wirkung von Cyst(e)in und Methionin auf die ÄSS/Taurin/Sulfataufnahme wurde bereits mehrfach untersucht: Danach beeinflussten Cystein und Methionin weder die Ausbildung des Sulfonsäure-Aufnahmesystems in Abwesenheit von Sulfat (4.2) noch die Aufnahmegeschwindigkeit von ÄSS/Taurin in größerem Umfang (5.6.2; 6.1.3). (Die Sulfataufnahme wurde dagegen in Anwesenheit von 3 mM Cystein im Aufnahmetest um 35 % abgesenkt (5.6.2)).

Ungeklärt blieb jedoch bisher die Frage, inwieweit die Zugabe dieser S-haltigen Aminosäuren zu ÄSS/Taurin/Sulfatkulturen das zukünftige Aufnahmeverhalten dieser Algen zu beeinflussen vermag.

Abb.44 zeigt die Veränderung von ÄSS/Taurin/Sulfataufnahme in 5 Tage gewachsenen ÄSS/Taurin/Sulfatkulturen von *Chlorella fusca* nach Zugabe von 0.3 mM Cystein. Danach konnte Cyst(e)in das Aufnahmeverhalten zumindestens kurzfristig in allen getesteten Fällen beeinflussen:

- ÄSS/Taurinaufnahme stiegen innerhalb von 3 Stunden auf etwa 300 % des Ausgangswertes an und behielten diese hohe Aufnahmerate für mindestens 6 Stunden bei, bevor sie auf das alte Niveau zurückkehrten.
- Sulfataufnahme in ÄSS/Taurinkulturen wurde durch 0.3 mM Cystein zunächst abgesenkt, ging aber innerhalb von 24 Stunden auf den Ausgangswert zurück
- Sulfataufnahme in Sulfatkulturen nahm nach Cysteinzugabe kontinuierlich ab und erreichte 24 Stunden später 35 % des Ausgangswertes.

Im Gegensatz dazu, ergab der analog durchgeführte Versuchsansatz mit 0.3 mM Methioninzugabe praktisch keine Veränderung des Aufnahmeverhaltens für ÄSS/Taurin oder Sulfat (nicht dargestellt).

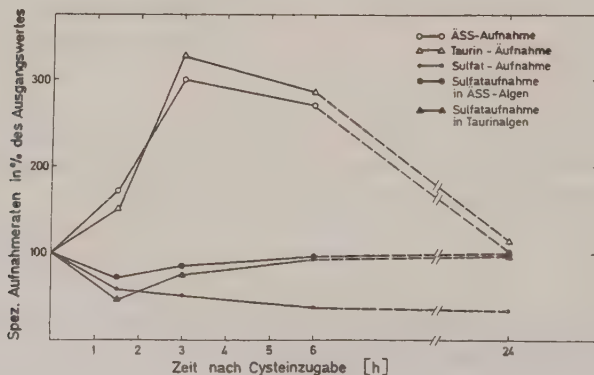


Abb.44: Veränderung von ÄSS/Taurin/Sulfataufnahme in *Chlorella fusca* nach Cysteinzugabe ins Kulturmedium

Chlorella fusca wurde nach 5 Tagen Kultivation auf 0.3 mM ÄSS/Taurin/Sulfat mit 0.3 mM Cystein versetzt. Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und bezüglich ÄSS/Taurin/Sulfataufnahme untersucht. Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.9.

8.2 Reaktionen auf zunehmenden S-Mangel im Kulturmedium

Zur Klärung der Reaktion *Chlorella fuscas* auf zunehmenden S-Mangel im umgebenden Medium, wurde die Alge auf Kulturmedien unterschiedlichen Sulfatgehaltes gezogen (0 mM bis 3 mM Sulfat). Nach 5 Tagen Wachstum wurden die Kulturen abgeerntet und auf folgende Größen untersucht: Zellzahl, Chlorophyll- und Proteingehalt, ÄSS- und Sulfataufnahme, sowie die Aktivitäten bestimmter Enzyme des S- und N-Stoffwechsels (Thiosulfatreduktase, Sulfataktivierung, Cysteinsynthase, Glutaminsynthetase).

Die Versuchsergebnisse sind in Abb.45, 46 und 47 graphisch zusammengestellt und zeigen eine klare Trennlinie bei 1/4 der üblichen Sulfatmenge des SL-1 Mediums:

- **Oberhalb dieser Sulfatkonzentration** (0.075 mM) lagen alle untersuchten Wachstumsparameter/Enzymaktivitäten **unverändert** zur SL-1 Sulfatkultur vor (Diese Übereinstimmung erstreckte sich sogar bis zur 10-fachen Sulfatkonzentration des SL-1 Mediums (3 mM, nicht eingezeichnet)).

Mit anderen Worten: Die in diesen Medien vorgegebene Sulfatmenge reichte aus, um nach 5tägigem Wachstum keine S-Mangelsymptome auftreten zu lassen.

- **Unterhalb dieser Sulfatkonzentration** veränderten sich die Werte wie folgt:

a) Wachstumsparameter (Abb.45)

Chlorophyll/Proteingehalt ging mit abnehmender Sulfatkonzentration kontinuierlich zurück; die Zellzahl der Kulturen besaß dagegen ein Maximum bei 0.012 mM Sulfat (1/25 der üblichen Sulfatmenge des SL-1 Mediums)

b) ÄSS- und Sulfataufnahme (Abb.46)

Beide Aufnahmeprozesse zeigten gesteigerte Aktivitäten, und zwar beide erstmalig nach 5 Tagen Wachstum auf einer Sulfatkonzentration unterhalb von 0.075 mM (Auftreten koinzident, siehe auch Kap.4).

c) Enzyme des S-Stoffwechsels (Abb.46/47)

Die Aktivitäten der "sulfataktivierenden Enzyme", sowie Thiosulfatreduktase und Cysteinsynthase nahmen unterhalb dieses "Schwellenwertes" deutlich zu. (Sulfataufnahme und Prozesse der Sulfataktivierung zeigten dabei übereinstimmende Aktivitätsmuster und ein scharfes Maximum bei 1/10 der SL-1 Sulfatkonzentration).

d) Enzyme des N-Stoffwechsels (Abb.47)

Die Aktivität der Glutaminsynthetase nahm unterhalb dieses "Schwellenwertes" von 0.075 mM kontinuierlich ab und stand damit im Gegensatz zu den Ergebnissen von c) (Aktivitätssteigerung der S-aufnehmenden/S-metabolisierenden Enzyme bei S-Mangel).

Abb.45

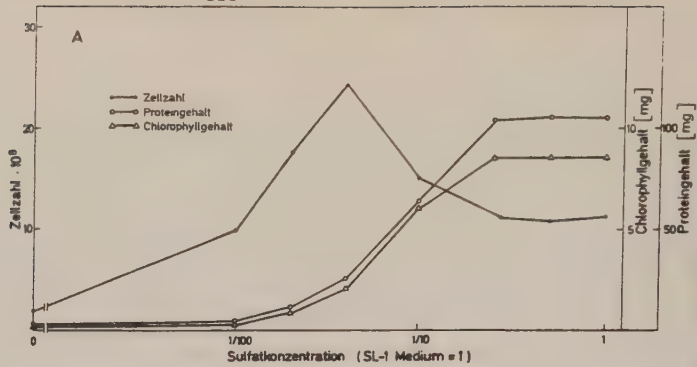


Abb.46

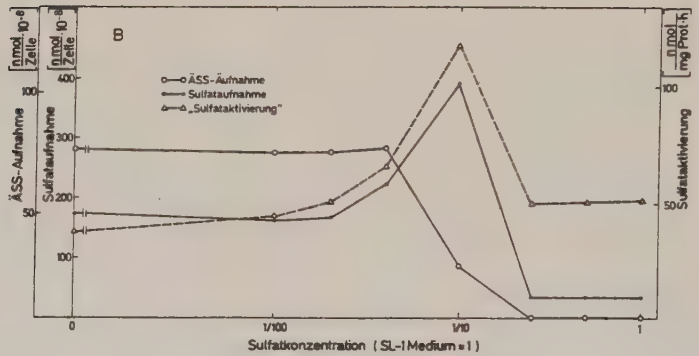


Abb.47

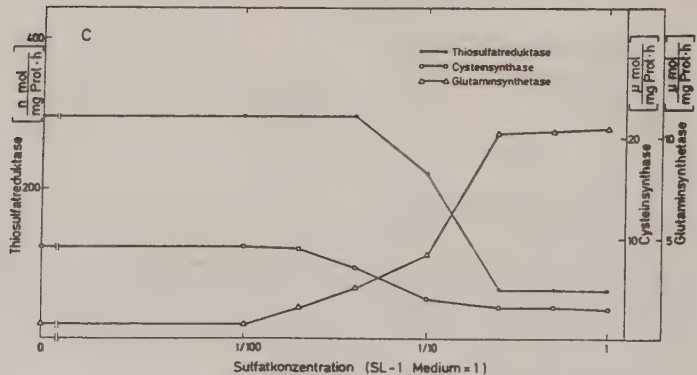


Abb.45: Veränderung der Wachstumsparameter bei zunehmendem S-Mangel im Kulturmedium

Chlorella fusca wurde auf Kulturmedien unterschiedlichen Sulfatgehaltes (0 mM bis 0,3 mM Sulfat) angezogen, nach 5 Tagen Wachstum abgeerntet (2.1.2) und bezüglich Zellzahl (2.1.3), Chlorophyll- und Proteingehalt untersucht (2.4.1-2.4.2).

Abb.46: Veränderung von ̑SS/Sulfataufnahme und Sulfataktivierung bei zunehmendem S-Mangel im Kulturmedium

Anszucht wie in Abb.45. Danach Bestimmung der ̑SS/Sulfataufnahme (2.7) und Höhe der Sulfataktivierung (2.6.7). Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.9.

Abb.47: Veränderung der enzymatischen Aktivität ausgewählter Enzyme bei zunehmendem S-Mangel im Kulturmedium

Anszucht wie in Abb.45. Nach Zellaufschluß (2.1.4) wurde die Aktivität von Thiosulfatreduktase (2.6.3), Cysteinsynthase (2.6.4) und Glutaminsynthetase (2.6.8) untersucht.

8.3 Reaktionen auf zunehmenden N-Mangel im Kulturmedium

Durch Anzucht auf Kulturmedien unterschiedlichen Nitratgehaltes (0 mM - 7.25 mM Nitrat) und nachfolgende Analyse der Kulturen analog zu 8.2, sollte das Verhalten Chlorella fusca bei beginnendem N-Mangel im Medium untersucht werden.

Wie im vorigen Kapitel 8.2 interessierte auch hier v.a. die zeitliche Abfolge der Reaktionen ("Strategien") bei allmählich auftretenden Mangelbedingungen.

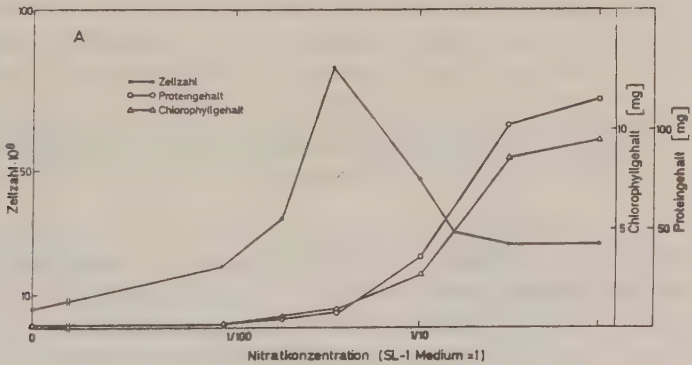


Abb.48

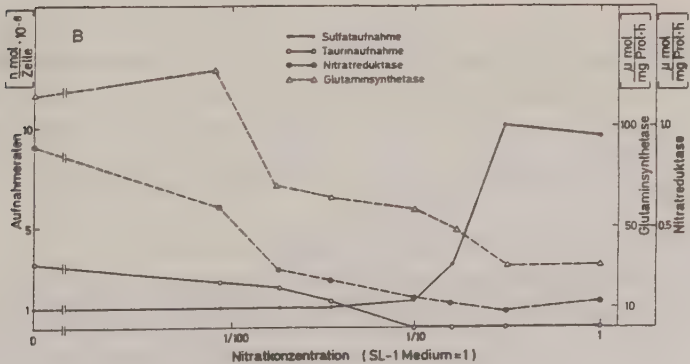


Abb.49

Abb.48: Veränderung der Wachstumsparameter mit zunehmendem N-Mangel im Kulturmedium

Chlorella fusca wurde auf Kulturmedien unterschiedlichen Nitratgehaltes (0 mM bis 7.25 mM Nitrat) angezogen, nach 7 Tagen Wachstum abgeerntet (2.1.2) und bezüglich Zellzahl (2.1.3), Chlorophyll- und Proteingehalt untersucht (2.4.1-2.4.2).

Abb.49: Veränderung von Sulfat/Taurinaufnahme und der enzymatischen Aktivität ausgewählter Enzyme mit zunehmenden N-Mangel im Kulturmedium

Anzucht wie in Abb.48. Danach Bestimmung der Sulfat /Taurinaufnahme (2.7) und der Aktivität von Nitratreduktase (2.6.9) und Glutaminsynthetase (2.6.8). Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb.9.

Die Versuchsergebnisse sind in Abb.48 und 49 zusammengestellt. Danach verhielten sich die untersuchten Größen bei zunehmendem N-Mangel folgendermaßen:

a) Wachstumsparameter (Abb.48)

Chlorophyll/Proteingehalt ging mit abnehmender Nitratkonzentration kontinuierlich zurück; die Zellzahl der Kulturen besaß dagegen (analog zu S-Mangelbedingungen, 8.2 ein Maximum bei nicht allzu starken Mangelbedingungen (1/30 der üblichen Nitratkonzentration des SL-1 Mediums).

b) Taurin und Sulfataufnahme (Abb.49)

Die beiden Aufnahmeprozesse verhielten sich mit zunehmendem N-Mangel gegenläufig:

- Die Sulfataufnahme (ein Maß für den Bedarf der Algenzelle an Schwefel) ging von Anfang an stark zurück
- Die Taurinaufnahme (ein "Indikator" für Aminosäure-Transportprozesse) setzte erst bei verschärftem Nitratmangel ein und erhöhte sich mit zunehmenden Mangelbedingungen

c) Enzyme des N-Stoffwechsels (Abb.49)

Sowohl Nitratreduktase wie Glutaminsynthetase steigerten ihre Enzymaktivitäten mit zunehmenden N-Mangelbedingungen.

Nachtrag zu Punkt 8.2 und 8.3

Die auffällige Erhöhung der Zellzahl/Kultur mit zunehmendem S/N-Mangel korrelierte mit der **mikroskopischen Erscheinungsform**: Das mikroskopische Aussehen der Kulturen änderte sich parallel zur Erhöhung der Zellzahl. Die Algenzellen zeigten nun nicht mehr den Habitus einer sulfat/nitratgewachsenen Zelle sondern den einer typischen Mangelzelle.

Beide Zelltypen unterschieden sich deutlich voneinander:

- Sulfat/nitratgewachsene Zellen Chlorella fuscas erschienen im Mikroskop länglich-oval, deutlich grün mit gut sichtbarem Pyrenoid.
- S/N-Mangelzellen waren im Gegensatz dazu deutlich kleiner, rund, farblos mit stark lichtbrechenden Strukturen im Zellinnern und verdickter Zellwand. Weitere Untersuchungen bestätigten das Fehlen chloroplastizidärer Strukturen (Thylakoide, Pyrenoid).

8.4 Veränderung ausgewählter Enzymaktivitäten bei Wachstum auf Äthansulfonsäure

Nach Untersuchung des Wachstums auf Äthansulfonsäure (Wachstumsparameter, Tab.3) und Bestimmung des veränderten Aufnahmeverhaltens bei ÄSS-Kulturen (4.2) sollte nun ein weiterer Aspekt der ÄSS-Ernährung in Chlorella fusca überprüft werden : Welchen Einfluß kann das Wachstum auf Äthansulfonsäure auf Enzymaktivitäten des S- und N-Stoffwechsels ausüben?

Nach 5 Tagen Wachstum auf Äthansulfonat (Erreichen der stationären Phase) wurden die ÄSS-Kulturen abgeerntet (2.1.2) und bezüglich folgender Enzyme analysiert:

Thiosulfatreduktase, Cysteinsynthase, Sulfataktivierung, Arylsulfatase,

D- und L-Cysteindesulphydrase sowie Glutaminsynthetase (2.6.3-2.6.8).

Zur besseren Vergleichbarkeit dieser Daten wurde Chlorella fusca parallel zu ÄSS auch auf Sulfat- bzw. S-Mangelmedium angezogen und untersucht (Tab.29).

a) Enzyme des S-Stoffwechsels

Die Aktivitäten dieser Enzyme waren i.a. bei ÄSS-gewachsenen Algen **höher** als bei Sulfatkulturen (z.B. Thiosulfatreduktase, D- und L-Cysteindesulphydrase) und lagen zwischen den Werten für Sulfatkulturen und S-Mangelkulturen. Abweichend davon, zeigten Sulfataktivierung und Arylsulfatase bei ÄSS-Algen eine deutlich höhere Aktivität als bei Sulfat- oder S-Mangelkulturen (siehe auch Abb.46).

b) Enzyme des N-Stoffwechsels

Die Aktivität der Glutaminsynthetase war bei ÄSS-Kulturen deutlich erniedrigt, lag aber zwischen den Werten für Sulfat- und S-Mangelkulturen.

Tab.29: Vergleich ausgewählter Enzyme bei Wachstum auf Äthansulfonat

Schwefelquelle	Thiosulfat-reduktase	Cystein-synthase	Sulfat-aktivierung	Aryl-sulfatase	D-Cystein-desulphydrase	L-Cystein-desulphydrase	Glutamin-synthetase
Na ₂ SO ₄	0.18	7.6	0.08	0	91.4 x 10 ⁻³	18.3 x 10 ⁻³	23.6
C ₂ H ₅ SO ₃ ⁻ Na ⁺	0.41	18.4	0.13	10.6	132.0 x 10 ⁻³	60.0 x 10 ⁻³	14.0
keine	0.62	8.4	0.035	0	145.0 x 10 ⁻³	168.2 x 10 ⁻³	c

Chlorella fusca wurde nach 5 Tagen Kultivierung auf 0.3 mM ÄSS, 0.3 mM Sulfat bzw. auf S-freiem SL-1 Medium abgeerntet, aufgeschlossen (2.1.2-2.1.4) und auf die Aktivität ausgewählter Enzyme des S- und N-Stoffwechsels untersucht (2.6.3-2.6.8).

Die Enzymdaten wurden normalisiert auf $\frac{\mu\text{mol}}{\text{mg Prot} \times \text{h}}$.

8.5 Zusammenfassung

Die Versuche in diesem Kapitel zeigten deutlich auf, wie **sensibel** die Grünalge Chlorella fusca auf Veränderungen des sie umgebenden (Kultur-)Mediums reagiert: Wachstum auf unterschiedlichen S-Verbindungen, Zugabe/Entzug von Schwefelquellen oder S- und N-Mangel verschiedenen Ausmaßes wurden von der Alge mit einer Fülle enzymatischer Umsteuerungen und gezielter Reaktionen beantwortet.

Die Reihenfolge, in der Aufnahme- und Enzymaktivitäten bei fortschreitenden S- oder N-Mangelbedingungen aktiviert/verändert werden, läßt einen Schluß zu auf die Hierarchie dieser Prozesse beim Überwinden des Mangelzustandes:

- Bei **S-Mangelbedingungen** setzten **ÄSS/erhöhte Sulfataufnahme** bereits zu einem recht frühen Zeitpunkt ein. Die Sulfataufnahme erreichte ein Maximum bei nicht allzu starken S-Mangelbedingungen und nahm wieder ab. Bei sich verschärfenden Mangelbedingungen erreichten andere S-beschaffende Enzyme (z.B. ÄSS-Permease, Thiosulfatreduktase) ein Maximum und behielten es bei. Gleichzeitig erhöhte sich zu diesem Zeitpunkt die Zellzahl der Kulturen, während Chlorophyll- und Proteingehalt mit zunehmenden Mangelbedingungen kontinuierlich abnahmen.
- Bei **N-Mangelbedingungen** begann Taurinaufnahme (bzw. Aminosäureaufnahme) erst bei verschärftem N-Mangelzustand, während Glutaminsynthetase oder Nitratreduktase bereits vorher aktiviert wurden. Bei sich verschärfendem N-Mangel fand auch hier Erhöhung der Zellzahl, sowie Abnahme von Protein- und Chlorophyllgehalt statt.
- Die Korrelation zwischen Schwefelernährung und N-Stoffwechsel (bzw. zwischen Stickstoffernährung und S-Stoffwechsel) wurde durch das Verhalten der Glutaminsynthetase bei S-Mangel (bzw. den Rückgang der Sulfataufnahme bei N-Mangel) in eindrucksvoller Weise bestätigt.

8.6 ANHANG: Veränderung von Fettsäure-und Aminosäure-Zusammensetzung
 bei unterschiedlicher S/N-Ernährung

A) Fettsäure-Zusammensetzung

Die Analyse der Fettsäure-Zusammensetzung in Chlorella fusca bei Variation der S/N-Ernährung wurde mit Hilfe gaschromatographischer Methoden von G.Henkelmann (Botanisches Institut, München) durchgeführt.

Tab.30 zeigt ausgehend von Sulfat/Nitrat-Kulturen ("Kontrolle") eine Verschiebung des Fettsäuregehaltes in Richtung ungesättigter Fettsäuren, v.a. die C_{18-1} Säure (Ölsäure) nahm bei Mangelbedingungen mehr als 50 % der bestimmten Fettsäuren ein. Diese Zunahme ungesättigter Fettsäuren wurde allerdings auch bei ÄSS-Kulturen beobachtet - ein Indiz für die Verschiebung des Regulationsniveaus in Richtung "Mangel" trotz unverändert guter Wachstumsparameter (Tab.3).

B) Aminosäure-Zusammensetzung

Die Analyse der löslichen Aminosäuren in Chlorella fusca wurde freundlicherweise von Prof.Dr.F.Fiedler, LMU-München durchgeführt (Abb.50).

Offensichtlich akkumulierten in S-Mangelkulturen v.a. basische Aminosäuren wie Arginin oder Histidin, ebenso NH_4^+ -Ionen, während ÄSS-und Sulfatkulturen ähnliche Zusammensetzungen aufwiesen. Allerdings war bei ÄSS-Kulturen der Gesamtgehalt an löslichen Aminosäuren gegenüber der Sulfatkontrolle leicht erhöht ("S-Mangel").

Tab.30: Die Fettsäure-Zusammensetzung in *Chlorella fusca* bei unterschiedlicher S/N-Ernährung

Fettsäure (% Gesamtgehalt)	Sulfatkultur	ÄSS-Kultur	S-Mangelkultur	N-Mangelkultur
C ₁₆	37.8	30.9	26.8	18.7
C ₁₆₋₁	0	0	0	1.3
$\sum C_{16}$	37.8	30.9	26.8	20.0
C ₁₈	5.0	2.0	4.4	3.8
C ₁₈₋₁	25.7	28.8	52.2	61.1
C ₁₈₋₂	7.6	8.6	3.7	7.0
C ₁₈₋₃	8.0	14.6	9.5	6.0
$\sum C_{18}$	46.3	54.0	60.8	77.9
C ₂₀	4.6	5.4	3.4	1.1
X("Ester")	11.3	9.8	0	1.1

Chlorella fusca wurde nach 5 Tagen Wachstum auf 0.3 mM ÄSS/Sulfat, bzw. S-Mangelmedium und N-Mangelmedium (7 Tage Wachstum) wie in Material und Methoden beschrieben aufgeschlossen und bezüglich der Fettsäure-Zusammensetzung analysiert (2.5.3). Die gewählten Abkürzungen beziehen sich auf die Zahl der Kohlenstoffatome bzw. Anzahl der Doppelbindungen im Molekül. (X stellt eine bisher noch unidentifizierte Fettsäure dar, deren % Anteil auf den analysierten "Ester" bezogen wurde).

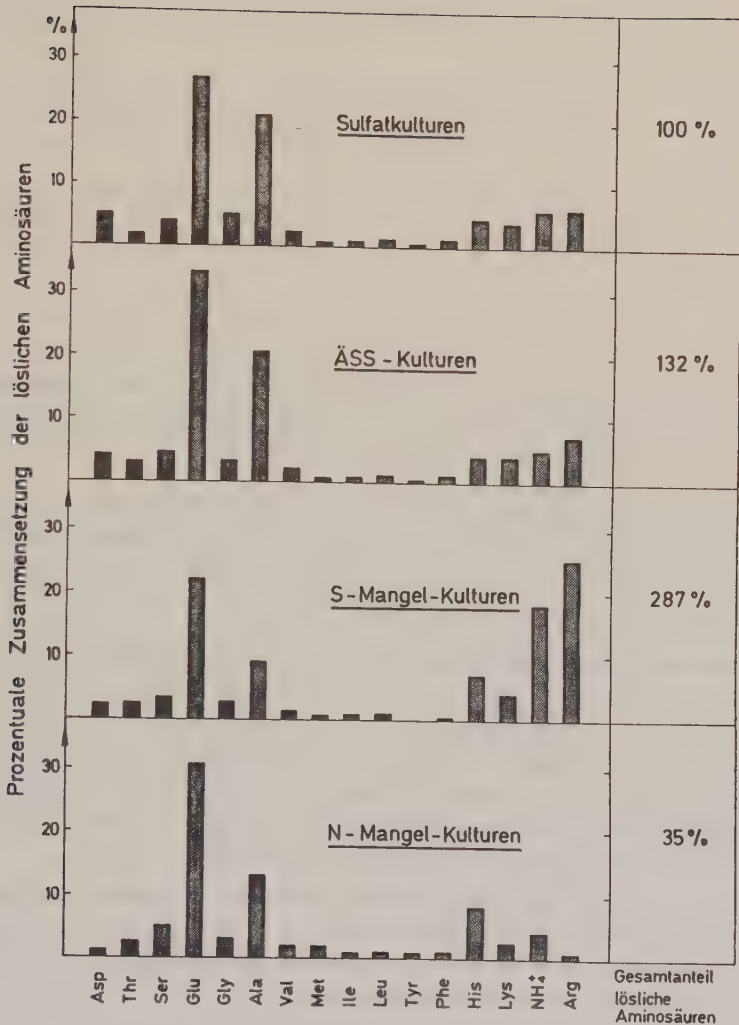


Abb.50: Die Aminosäure-Zusammensetzung in *Chlorella fusca* bei unterschiedlicher S/N-Ernährung

Chlorella fusca wurde nach 5 Tagen Wachstum auf 0.3 mM ÄSS/Sulfat, bzw. S-Mangelmedium und N-Mangelmedium (7 Tage Wachstum) wie in Material und Methoden beschrieben aufgeschlossen und bezüglich der Aminosäure-Zusammensetzung analysiert (2.5.4).

D. Diskussion

Die natürliche Schwefelquelle im aquatischen System ist **Sulfat**, das im Süßwasser (je nach Eutrophiegrad) in Konzentrationen von 0.11-0.18 mM und im Meerwasser mit 27 mM in ausreichendem Maße vorliegt (41).

Trotzdem ist die Fähigkeit, Sulfonsäuren potentiell als "Ersatzschwefelquelle" neben Sulfat verwerten zu können, durchaus kein Einzelfall einer speziellen Alge (z.B. Chlorella fusca) sondern v.a. bei Grünalgen ein weitverbreitetes Phänomen mit denkbaren ökologischen Vorteilen.

Im Versuch wachsen zahlreiche der getesteten Grün- und Blaualgen auf kurzkettigen aliphatischen Sulfonsäuren als einziger S-Quelle im Medium. Ihr Wachstum auf Verbindungen wie Äthansulfonsäure oder Taurin ist gut und ziemlich vergleichbar dem Wachstum auf der sonst üblichen Schwefelquelle Sulfat. Abgesehen von äußerlich nicht sichtbaren Mangelsymptomen weisen diese Kulturen allerdings ein verändertes Aufnahmeverhalten (Sulfat, Sulfonsäuren) bzw. eine von Sulfatkulturen abweichende Aktivität vieler Enzyme des S- und N-Stoffwechsels auf.

Weitergehende Untersuchungen zu diesen Punkten wurden mit Hilfe der Grünalge Chlorella fusca 211-8b durchgeführt. Dieser Algenstamm zeichnet sich neben der schon in 2.1 genannten guten Kultivierbarkeit und hohem Bekanntheitsgrad des S-Stoffwechsels durch folgende Vorteile aus:

- Chlorella fusca gehört zu den mikrovakuolären Grünalgen (116,159) und kann daher im Gegensatz zu vielen anderen Organismen, Sulfat u.ä. Schwefelverbindungen nicht in größeren Mengen in der Vakuole speichern (siehe höhere Pflanzen (42,50)).
- Chlorella fusca besitzt keine S-Speicherverbindungen im Cytoplasma, die bei Bedarf mobilisiert werden könnten, wie es analog von den Polyphosphaten als P-Reserve in der Alge bekannt ist (67, 136). (Die Rolle Glutathions als Speicher reduzierter S-Verbindungen bei Algen ist bislang noch ungeklärt).

- Chlorella fusca kann reduzierte Schwefelverbindungen wie z.B. Cystein nur langsam und nicht quantitativ zu Sulfat aufoxidieren (siehe auch (151)).
- Chlorella fusca besitzt einen nachweisbaren Sulfatpool, in dem sich nach längerer Inkubation radioaktiv markiertes Sulfat wiederfinden läßt (Lemna minor: Der freie Sulfatpool besteht nur aus 1 % des Gesamtzellschwefels - (193)).
- Chlorella fusca wächst gut auf den verschiedenartigsten Sulfonsäuren als einziger Schwefelquelle und weist hohe Aufnahme/Metabolisierungsraten für diese Verbindungen auf.

Vor allem der letzte Punkt demonstrierte die große Variabilität an verwertbaren Sulfonsäuren für Chlorella fusca 211-8b: Die meisten der aliphatischen Sulfonate unterstützten das Algenwachstum ähnlich gut wie Sulfat, während Arylsulfonsäuren i.a. nur sehr schlecht verwertet wurden. Auf anderen Sulfonsäuren wuchs die Alge dagegen noch besser als in der entsprechenden Sulfatkultur (Tab.2).

Für das differierende Wachstum auf Sulfonsäuren als einziger S-Quelle gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten: Zum einen die unterschiedliche Stabilität der C-S Bindung in der Sulfonsäure selbst, die der Alge einen enzymatischen Angriff an der C-S Bindung erleichtern/erschweren kann.

Aus diesem Grunde sollten v.a. Sulfonsäuren mit relativ schwachen C-S Bindungen am besten als Schwefelquelle genutzt werden können. Unterstützung findet diese Überlegung durch die Wachstumsversuche auf C_1-C_8 n-Alkan-1-sulfonsäuren (Abb.1: Optimales Wachstum auf Äthansulfonsäure). Das Aussehen dieser Optimumskurve entsprach weitgehend früheren Untersuchungsergebnissen von Wagner und Reid (203), die die Stabilität aliphatischer Sulfonsäuren bei stark alkalischen Bedingungen untersucht hatten (3.7 N NaOH bei 345 °C für 3 Stunden). Die Autoren zeigten eine Korrelation zwischen Stabilität der C-S Bindung und Hydrolyseempfindlichkeit auf, die mit Abb.1, bzw. den dort erzielten Wachstumsergebnissen übereinstimmte: So erwies sich die Äthansulfonsäure als "labilste" Verbindung, die einer Hydrolyse am leichtesten unterlag, wohingegen Methansulfonsäure/höhere Homologa vergleichsweise schwerer zu hydrolysieren waren. Insgesamt gesehen, bestätigte sich damit die gute Übereinstimmung zwischen Stabilität der C-S Bindung einer Sulfonsäure (bzw. der Hydrolyseempfindlichkeit) und ihrer nachfolgenden Verwertbarkeit durch Chlorella fusca.

Benachbarte elektronegativer funktionelle Gruppen können ferner dazu beitragen, die ursprüngliche C-S Bindung noch stärker zu polarisieren und demzufolge deren Reaktivität (bzw. Abbaubarkeit) zu erhöhen. Je nach Art der funktionellen Gruppe

ist sogar (siehe Taurin) damit zu rechnen, daß der primäre enzymatische Angriff an einer solchen funktionellen Gruppe erfolgt und die Spaltung der C-S Bindung "nur" nachgeschaltet ist (109, 177).

Neben diesen rein energetischen Verhältnissen im Molekülbau können noch zahlreiche andere Faktoren das Wachstum der Alge auf Sulfonsäuren beeinflussen:

- Aufnahmemechanismen
- Einschleusung der Sulfonsäuren in bereits existierende Abbauewege (z.B. Sulfoacetat, Sulfolactat liegen auch als Zwischenprodukte des sulfoglycolytischen Weges vor - (120))
- Verwertbarkeit des C-Restes (z.B. Überführung der desaminierten/desulfonierten C₂-Einheit aus Taurin in den Glyoxylsäurecyclus - (179))
- Hemmeffekte der Sulfonsäuren/ihrer Abbauprodukte in der Zelle (z.B. die bei der Metabolisierung aromatischer Sulfonsäuren entstehenden Zwischenprodukte aus der Phenol- und Catecholreihe)

Aus der Fülle gut verwertbarer Sulfonsäuren (Tab.2) wurden zwei Verbindungen ausgewählt und in die folgenden Versuche (Aufnahme/Metabolisierung) eingesetzt: **Äthansulfonsäure** und **Taurin** (2-Aminoäthansulfonsäure).

Zuerst wurde nur mit Äthansulfonsäure gearbeitet, da die Gefahr bestand, daß der Sulfonsäuregruppe benachbarte Amino- bzw. Carboxylgruppen als enzymatische Erkennungs-/Angriffspunkte dienen könnten und damit die Ableitung genereller Reaktionsmechanismen verfälschten.

Dieser Vorbehalt bestätigte sich jedoch nicht (da Taurin und Äthansulfonsäure gleichermaßen aufgenommen und metabolisiert werden) und der Einsatz von Taurin als zweites Untersuchungsobjekt bei Chlorella fusca erbrachte viele Vorteile:

- Abkopplung der Seitengruppeneffekte vom eigentlichen Aufnahme/Metabolisierungsmechanismus: Generalisierung der beobachteten Effekte

So konnte z.B. das unterschiedliche Aufnahmeverhalten der Alge in Abhängigkeit von herrschenden Mangelbedingungen im Medium (S/N) nur durch den Einsatz einer β -Aminosulfonsäure mit zwei funktionellen Gruppen im Molekül geklärt werden.

Vorteilhaft erschienen auch folgende Punkte:

- Klärung der Aufnahme/Metabolisierung von Taurin (eine der biologisch wichtigsten Sulfonsäuren) bei photosynthetischen Organismen
- Beschreibung eines neuartigen Taurin-Aufnahmesystems, abweichend von den bisher bekannten bakteriellen und tierischen Systemen

1.) Diskussion der Aufnahme-prozeße

Voraussetzung für das gute Wachstum der Alge Chlorella fusca auf ÄSS/Taurin war die adaptive Fähigkeit der Grünalge, diese Sulfonsäuren aufzunehmen und nachfolgend abbauen zu können. Beide Prozesse wurden anhand sulfonatgewachsener Algenkulturen untersucht und ergaben im folgenden eindeutige Hinweise auf ein **generelles Sulfonsäure-Aufnahmesystem** ("Permease") bzw. einen gemeinsamen Abbauweg für kurzkettige, aliphatische Sulfonsäuren.

Die Aufnahme von Äthansulfonat und Taurin erfolgte über ein temperatur-, pH-, energie- und konzentrationsabhängiges System ("Permease"), war unidirektional und zeigte eine MICHAELIS-MENTEN-Sättigungskinetik. Sie erfüllte damit alle Bedingungen eines carrier-vermittelten, aktiven enzymähnlichen Permeationsprozeß und besaß für beide Verbindungen gemeinsame Charakteristika (Tab.31).

Der Vergleich mit dem konstitutiven Sulfataufnahmesystem in Chlorella fusca erlaubte ferner die **Eigenständigkeit und Spezifität** dieses Transportsystems zu konstatieren. Obwohl in all diesen Versuchen (Sulfat/Schwefel-Mangelbedingungen) ÄSS/Taurin-Aufnahme mit erhöhter Sulfataufnahme korreliert war, konnte dennoch durch eingehende Untersuchungen nachgewiesen werden, daß Sulfonattransport nicht als Seitenreaktion der Sulfatpermease anzusehen ist (Tab.31).

Tab.31: Vergleichende Zusammenfassung: ÄSS/Taurin/Sulfat-Aufnahme in Chlorella fusca

	Sulfataufnahme (Sulfatkultur)	ÄSS-Aufnahme (ÄSS-Kultur)	Taurinaufnahme (Taurinkultur)	Taurinaufnahme (N-Mangelkultur)
Ka-Wert	1.2×10^{-5} M	5.0×10^{-5} M	5.5×10^{-5} M	1.1×10^{-3} M
pH-Optimum	9.0	7.8	7.8	4.8
Temperaturoptimum	43 °C	33 °C	-.-	-.-
Substratspezifität	Anionen des Typs XO_4^{2-} <u>Nicht:</u> Sulfonsäuren	Sulfonsäuren <u>Nicht:</u> Sulfat, Monocarbonsäuren, Monovalente anorg. Anionen wie NO_3^- , Cl^-	Sulfonsäuren <u>Nicht:</u> Sulfat Aminosäuren, β -Ala	Aminosäuren (einschl. β -Alanin) <u>Nicht:</u> Sulfonsäuren
Metabolische Inhibitoren	DMBIB, 2,4-DNP, CCCP, DCCD, NEM Cyanid, Azid, DCMU "Dunkelheit"	DMBIB, 2,4-DNP, CCCP, DCCD, NEM PCMBs (Cu^{2+}) PMSF, Äthanol	DMBIB, 2,4-DNP, CCCP, DCCD, NEM PCMBs (Cu^{2+}) PMSF, Äthanol	-.-
Phosphat-effekt	-	++	++	-.-
Nachfolgende Metabolisierung gewährleistet	ja	ja	ja	nein

Auch die deutlichen Unterschiede der Aufnahmeprozesse unter S/N-Mangelbedingungen ermöglichten es, die Bedingungen für die spezifische Aufnahme von Sulfonsäuren näher herauszustellen. Je nach herrschenden Mangelbedingungen änderte sich die strukturelle Voraussetzung für die Reaktion mit dem vorliegenden Aufnahmesystem: Kompetitierte die Taurinaufnahme im Falle des Sulfat/Schwefel-Mangels mit anderen Sulfonsäuren, so wurde unter N-Mangelbedingungen die Taurinaufnahme durch andere Aminosäuren stark beeinflusst. Weitere Unterscheidungsmerkmale siehe Tab.31 .

Unbeeinflusst von diesen Seitengruppeneffekten (Taurin = β -Aminosulfonsäure) fand die **ÄSS-Aufnahme** nur unter Sulfat/Schwefel-Limitierung statt und wurde daher zur Aufklärung des generellen Aufnahmemechanismus eingesetzt.

ÄSS-Aufnahme findet durch ein eigenständiges Aufnahmesystem mit spezifischen Bindungsstellen für "Sulfonsäuren" statt, wie die Hemmeffekte der Strukturanaloga im Vergleich zur relativen Unwirksamkeit anderer monovalenter Anionen (Cl^- , NO_3^- , Acetat, Propionat) oder divalenter Anionen (SO_4^{2-}) zeigten. Strukturelle Voraussetzung für die Reaktion mit dem "ÄSS-Aufnahmesystem" ist anscheinend nur die Sulfonsäuregruppe selbst. Darüber hinaus kann das Transportsystem weder zwischen den einzelnen Strukturanaloga unterscheiden noch bevorzugt es die Aufnahme eines der getesteten Sulfonate (5.6.1).

Es schien daher sinnvoll, diese Art der Substratspezifität zusammen mit anderen gemeinsamen Charakteristika (pH-Optimum, das Verhalten gegenüber metabolischen Inhibitoren) als Indizien für ein "**generelles Sulfonsäure-Aufnahmesystem**" in Chlorella fusca anzusehen. Anstelle der Bezeichnungen ÄSS-Permease oder Taurin-Aufnahmesystem sollte daher besser der Begriff einer **Sulfonsäurepermease** treten (analog zu den allgemeinen Aminosäure-Aufnahmesystemen anderer Organismen). Gleichzeitig ließe sich mit dieser Annahme auch die große Vielfalt an verwertbaren Sulfonsäuren erklären, die Chlorella fusca zur Deckung ihres S-Bedarfs heranziehen kann.

Ausgehend von diesen Überlegungen ("Allgemeine Sulfonsäurepermease") lassen sich die Voraussetzungen für die Erkennung/Bindung einer bestimmten Sulfonsäure an die **Substratbindungsstelle** diskutieren:

- Die Sulfonsäuregruppe wird nur in dissoziierter Form als einfach negativ geladenes Anion akzeptiert.
- Die Sulfonsäuregruppe wird aufgrund ihrer charakteristischen Raumgeometrie und Ladungsverteilung erkannt und von anderen monovalenten/divalenten Anionen klar unterschieden (Abb.50) (z.B. Monocarboxylate, Chlorid, Nitrat, Sulfat....)
- Benachbarte funktionelle Gruppen beeinflussen die Erkennung der Sulfonsäuregruppe nicht

- Austausch der Atome im anschließenden C-Skelett beeinflusst die Erkennung der Sulfonsäuregruppe nicht (Aminoäthylsulfat (C-O-S) bzw. Sulfaminsäure (R-N-S) hemmen die Taurinaufnahme vergleichbar zur 10-fachen Taurinzugabe).

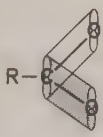
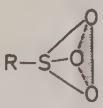
Wichtige Anmerkung zur Substratspezifität

Die Sulfonsäurepermease in *Chlorella fusca* diskriminierte Monocarboxylate und andere anorganische Anionen (unterschiedliche Raumgeometrie/Ladungsverteilung) und erkannte spezifisch sulfonsäuregruppen-enhaltende Verbindungen. Vor allem die klare Unterscheidung Sulfonsäure/Carboxylgruppe (der biologisch wichtigsten, häufigsten Säurefunktion) zeugt für die hohe Selektivität des Stoffwechsels der Alge und soll aufgrund seiner großen Bedeutung näher ausgeführt werden.

Vergleich Carboxyl/Sulfonsäuregruppe: Die folgende Skizze gibt die wichtigsten strukturellen Komponenten einer Sulfonatgruppe im Vergleich zur Carboxylgruppe wieder: Während z.B. die Carboxylgruppe planar vorliegt, mit delokalisierter Ladung und zwei äquivalenten O-Atomen (Abb.51), besitzt die Sulfonatgruppe die Form einer trigonalen Pyramide mit drei äquivalenten O-Atomen an der Basis und einer delokalisierten negativen Ladung.

Aus dieser Anordnung ergibt sich ein **charakteristisches Muster**, das von der Alge anscheinend spezifisch erkannt werden kann.

Abb.51: Struktureller Vergleich von Carboxyl- und Sulfonatgruppe (35,146)

	Carboxylgruppe	Sulfonatgruppe
Räumliche Anordnung		
Mesomere Grenzstrukturen	$\text{R}-\text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{O} \end{array} \longleftrightarrow \text{R}-\text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O}^- \\ \searrow \text{O} \end{array}$	$\text{R}-\text{S} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{O} \\ \downarrow \text{O} \end{array} \longleftrightarrow \text{R}-\text{S}=\text{O} \longleftrightarrow \text{R}-\text{S} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{O} \\ \downarrow \text{O}^- \end{array}$

Zusätzlich zu dieser **Substratspezifität** weisen nach Cabantchik und Rothstein (32) alle Anionenerkennungsregionen gemeinsam zugrundeliegende Prinzipien auf, z.B. die Anwesenheit positiv geladener Gruppen mit Anionenbindungskapazität (Amino- oder Guanidinogruppen) an der Substraterkennungsstelle.

Bei Erythrozyten konnte z.B. nachgewiesen werden, daß die Mikroumgebung der Substraterkennungsregion im Anionentransportsystem neben positiven Ladungen auch funktionelle Gruppen mit Elektronendonorkapazität enthält und in einem hydrophoben Umfeld eingebettet ist (9). Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die Bindungsstelle des Monocarboxylatcarriers in Erythrozyten publiziert (53).

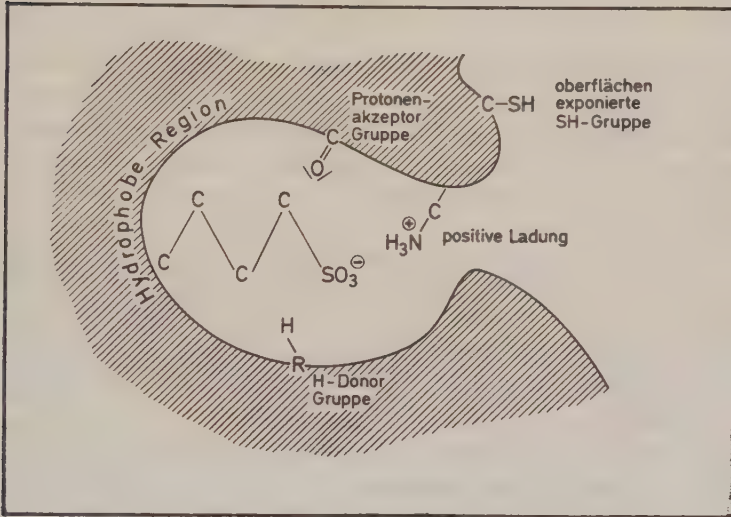
Analoge Prinzipien zur Ladungserkennung/Ladungsausgleich von Anionen sollten auch im Falle des Sulfonsäure-Aufnahmesystems in Chlorella fusca gültig sein. So zeigten beide Inhibitoren des Anionentransportes in Erythrozyten, DIDS und SITS (die Aufnahmesysteme durch Anlagerung und kovalente Bindung des Stilbenmoleküls an oberflächenexponierte Aminogruppen der Substraterkennungsregion blockieren können) eine Hemmung der ÄSS/Taurinaufnahme. Dabei bewirkte DIDS, das zwei aminoreaktive Isothiocyanatgruppen im Molekül enthält, eine stärkere Aufnahmehemmung als SITS. Insgesamt war jedoch diese Hemmung vergleichsweise moderat und könnte daher für das Auftreten "verborgener" Aminogruppen an der Substratbindungsstelle sprechen, die z.B. in einer Membraneinstülpung durch impermeable Hemmstoffe nicht so leicht zu deaktivieren sind.

Auf der Basis dieser Überlegungen und der früher gezeigten Substratspezifität des Sulfonsäure-Transportsystems (5.6.1-5.6.2) läßt sich ein möglicher Aufbau der Substratbindungsstelle entwerfen (siehe auch Deutecke (53)).

Folgende strukturellen Elemente könnten vorliegen (Abb.52) :

- 1- Die Anwesenheit einer positiv geladenen Gruppe (z.B. NH_3^+), die Sulfonsäuren zu binden vermag.
- 2- Die Anwesenheit einer protonenakzeptierenden Gruppe, die die Bindung von Substraten mit H-Donorgruppen (z.B. OH^-) erleichtert.
- 3- Die Anwesenheit von H-Donorgruppen, die auch die Bindung von Substraten mit H-Akzeptorgruppen (z.B. NH_2^-) erleichtert.
- 4- Gewisse geometrische Konstanten, die Bindung bzw. Transport von Sulfonsäuren erleichtern/erschweren können (z.B. aromatische Gruppen im Molekül einer Sulfonsäure beeinflussen die ÄSS-Aufnahme weniger stark als aliphatische).
- 5- Die Anwesenheit einer hydrophoben Domäne, die die Bindung von Substraten mit unpolaren Enden bevorzugt (z.B. n-Alkansulfonsäuren blockieren ab den hydrophoberen C_5 -Homologa die ÄSS-Aufnahme fast vollständig).
6. Das Auftreten einer oberflächenexponierten SH-Gruppe, die mit Hilfe von PCMBs nachgewiesen werden kann.

Abb.52: Schematischer Aufbau der Substratbindungsstelle des Sulfonsäure-Aufnahmesystems in Chlorella fusca (Modell)



Da es bis jetzt nicht möglich war, die ÄSS-Poolgröße quantitativ zu bestimmen, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die ÄSS-Aufnahme gegen einen Konzentrationsgradienten stattfindet - wie es z.B. für die Sulfataufnahme in Chlorella fusca leicht möglich ist.

Die maximale Sulfatkonzentration, die aufgrund passiver Diffusion und eines negativen Membranpotentials in den Zellen Chlorella fuscas erreicht werden kann, ist durch die NERNST'sche Gleichung vorgegeben:

$$E \text{ (mV)} = \frac{58}{z} \lg \frac{C_a}{C_i}$$

E : Membranpotential in mV

z : Valenz des Sulfations

C_a : Externe Sulfatkonzentration

C_i : Interne Sulfatkonzentration

Bei einem Membranpotential von -46 mV (116) und einer externen Sulfatkonzentration von 0.3 mM beträgt der maximale Wert für C_i, der über passive Diffusion erreicht werden kann: 0.008 mM. Da andererseits die intracelluläre Sulfatkonzentration in Chlorella fusca aufgrund Aufnahme/Metabolisierungsraten auf 1 mM geschätzt wurde

(s.u.) muß bei dieser Aufnahme eine 125-fache Konzentrierungsarbeit geleistet werden. Sulfat wird demzufolge in einem aktiven Prozeß unter Energieverbrauch und entgegen einem elektrochemischen Potentialgradienten in die Zelle aufgenommen.

Eine vergleichbare Antwort für die ÄSS-Aufnahme ist aufgrund fehlender Daten so nicht möglich. Allerdings liegt die ÄSS-Konzentration, die nach der NERNST'schen Gleichung über Diffusion entgegen dem Membranpotential erreicht werden kann bei 0.048 mM - und damit weit unterhalb der geschätzten Größe des Sulfatpools (dem Hauptprodukt des ÄSS-Abbaus in der Zelle).

Abgesehen davon, zeigte die ÄSS-Aufnahme alle Kriterien eines **aktiven Transports**: Sie war energieabhängig, spezifisch und hatte eine Sättigungskinetik. Die Natur der eigentlichen **Energiequelle** bedarf jedoch noch weiterer Diskussion und zur Herausstellung ihrer Besonderheiten den direkten Vergleich (Tab.12) mit der Sulfataufnahme:

- Einerseits wirken die metabolischen Inhibitoren DMBIB, 2,4-DNP, CCCP und DCCD stark aufnahmehemmend
- Andererseits beeinflussen Azid, Cyanid, DCMU und "Dunkelheit" die ÄSS-Aufnahme praktisch nicht

Anscheinend wird für die Aufnahme des einfach negativ geladenen Sulfonatanions ein so kleiner Teil der metabolischen Energie in Form von ATP benötigt, daß bei "einfachen" Hemmstoffen der Atmung und Photosynthese die jeweils noch vorhandene zelluläre Energie ausreicht, um die ÄSS-Aufnahme zu unterstützen.

Im Gegensatz dazu, reagierte die Sulfataufnahme (divalentes Anion) wesentlich sensibler auf metabolische Inhibitoren als die ÄSS-Aufnahme und konnte im Licht energiemäßig aus Photosynthese oder Atmung unterstützt werden. Diese Annahme wurde durch einen Dunkelversuch bestätigt, bei dem durch 3 mM Glucosezugabe die Dunkelaufnahmerate (52 %) bis fast auf den Lichtwert erhöht wurde (Abb.17). Die Herabsetzung der Sulfataufnahme im Dunkeln war somit eine Energiefrage, die durch Zufuhr zusätzlicher Energie gelöst werden konnte.

Beide Aufnahmesysteme scheinen demnach in unterschiedlichem Maße energieabhängig zu sein und die jeweils für den Stofftransport benötigte Energie aus verschiedenen Stoffwechselquellen zu beziehen. Die Glycolyse spielte hierbei eine untergeordnete Rolle, da nur Hemmstoffe der Photosynthese bzw. Respiration Effekte auf die untersuchten Ionenaufnahmen aufwiesen (Tab.12).

Vor allem der Einsatz von DMBIB (Dibromothymochinon), das als Antagonist zu Plastochinon und Ubichinon in die energieliefernden Prozesse der Photosynthese und der Respiration eingreift, zeigt die Abhängigkeit der $\dot{A}SS$ -Aufnahme von zellulärer Energie deutlich auf.

Noch deutlicher wird die Abhängigkeit durch den Einsatz von Entkopplern, wie z.B. 2,4-DNP und CCCP (sogenannte "Protonophora"). Insbesondere CCCP ist ein äußerst effektiver Hemmstoff der $\dot{A}SS$ -bzw. Sulfataufnahme in Chlorella fusca. Selbst in Konzentrationen von 10^{-5} bis 10^{-6} M vermag diese schwache Säure Photophosphorylierung und oxidative Phosphorylierung einer Zelle zu entkoppeln, indem sie den nach der MITCHELL-Theorie energieliefernden Protonengradienten durch Chloroplasten- und Mitochondrienmembranen abbaut. Darüber hinaus zerstört CCCP auch die Protonengradienten im Plasmalemma - und damit die Fähigkeit zur aktiven Ionenaufnahme (s.u.).

Nach Tab.12 erwies sich die Sulfataufnahme CCCP gegenüber um eine Größenordnung empfindlicher als die $\dot{A}SS$ -Aufnahme, was auf die größere Abhängigkeit der Sulfataufnahme von metabolischer Energie/Protonengradienten des Plasmalemmas hindeutet. Dies könnte z.B. dem Unterschied im Transport eines monovalenten ($\dot{A}SS$) zu einem divalenten Ion entsprechen. Gleichzeitig könnte die geringere Empfindlichkeit der $\dot{A}SS$ -Aufnahme auch auf einen differenzierenden Aufnahmemechanismus hindeuten.

Auch der ATPase-Hemmstoff DCCD beeinflusste die Sulfataufnahme um eine Größenordnung stärker als die $\dot{A}SS$ -Aufnahme, die selbst von 1 mM DCCD-Konzentrationen nicht vollständig gehemmt wurde. Die erhöhte Empfindlichkeit der Sulfataufnahme könnte wie bei CCCP als eine größere Energieabhängigkeit der Stoffaufnahme bzw. der Abhängigkeit von einem stabilen Protonengradienten im Plasmalemma diskutiert werden. Möglicherweise deutet aber die geringere Empfindlichkeit der $\dot{A}SS$ -Aufnahme gegenüber DCCD und CCCP auch auf einen primären aktiven Transportmechanismus hin, der trotz depolarisierter Zellmembran noch stattfinden kann.

Die Taurinaufnahme (Tab.18) zeigt ähnliche/identische Abhängigkeiten gegenüber den eingesetzten metabolischen Inhibitoren wie die $\dot{A}SS$ -Aufnahme. Allerdings vermögen gewisse Hemmstoffe die Taurinaufnahme durch Reaktion mit der β -Aminogruppe stärker zu beeinflussen (z.B. Azid).

Insgesamt gesehen, scheint jedoch die Taurinaufnahme (wie von einem generellen Sulfonsäure-Aufnahmesystem zu fordern) im gleichem Maße energieabhängig zu sein wie die $\dot{A}SS$ -Aufnahme und denselben Prinzipien zu gehorchen.

Die ÄSS-Aufnahme wurde durch polyvalente Kationen 2-3fach gefördert (Ausnahme: Schwermetallionen wie Hg^{2+} , Cu^{2+}). Dieser **Kationeneffekt** kann laut Literatur auf mehreren Ursachen beruhen (19, 46, 98, 167) :

- Reduktion des Oberflächenpotentials
- Einstellung einer für Aufnahmeprozesse optimalen Ionenstärke per se (z.B. über die "richtige" oder die "optimale" Konformationsform des Aufnahmesystems)
- Spezifische Effekte eines besonderen Metallions (Na^+ , Ca^{2+} ...)
- Komplexeationseffekte
(auszuschließen, da alle Sulfonate, einschl. der Ba-Salze wasserlösliche Verbindungen darstellen)

Die Gleichartigkeit der Ioneneffekte bei ASS- und Sulfataufnahme deutet auf ein gemeinsam zugrundeliegendes Prinzip hin. Spezifische Effekte einzelner Metallionen sind damit auszuschließen. Andererseits zeigt der Kationeneffekt bei ÄSS/Sulfataufnahme zwar eine prinzipielle Übereinstimmung, graduell liegen aber in einigen Punkten Abweichungen vor, die eine Aufnahmebeeinflussung über die **Reduktion des Oberflächenpotentials** nahelegen:

So wurde die ÄSS-Aufnahme durch 3 mM Kationen wesentlich stärker beeinflusst als die Sulfataufnahme (der Transport des zweifach negativ geladenen Sulfatanions wird bei noch höheren Salzkonzentrationen deutlicher gefördert) und monovalente Kationen zeigten eine Stimulierung der ÄSS-Aufnahme in der Reihenfolge ihrer Ionenstärke. Ferner wurde die ÄSS-Aufnahme durch di-/trivalente Ionen in etwa gleichermaßen stimuliert, während bei 3 mM Kationenkonzentration eine Steigerung der Sulfataufnahme von mono- über di- zu trivalenten Kationen zu notieren war.

Kationeneffekte wurden auch für die Sulfataufnahme in Hefen nachgewiesen (167) und von den Autoren analog erklärt: "Multivalente Kationen können die Aufnahme von Anionen via Reduktion des Oberflächenpotentials stimulieren. Diese Reduktion begünstigt die Akkumulation von Anionen an der Zellmembran-Lösung-Grenzfläche und beschleunigt so die Rate der Anionenaufnahme ganz allgemein".

Mit anderen Worten, multivalente Kationen begünstigen über den Ladungsausgleich die Akkumulation von Sulfonat/Sulfat-Anionen an der Zellmembran und unterstützen so die Annäherung-Bindung an das jeweilige Aufnahmesystem - wobei begleitende Effekte über Membranpotential oder Zell-pH nicht ausgeschlossen werden können.

Taurin, das sich im Zuge des Gleichgewichtes neutral geladen der Zelloberfläche bzw. dem Aufnahmesystem annähern kann, zeigte demzufolge keine Beeinflussung des Transportes durch multivalente Kationen. Im Gegensatz zu bakteriellen und tierischen Systemen findet Taurinaufnahme auch in Abwesenheit von Natriumionen statt und wird in Gegenwart von Na^+ nicht erhöht (12).

ÄSS- und Taurinaufnahme werden ferner durch die Anwesenheit von Phosphationen im Aufnahmetest hochspezifisch (im Gegensatz zur Sulfataufnahme) stimuliert. Dieser **Phosphateffekt** kann nicht über die Beeinflussung des Energiestoffwechsels allein erklärt werden, da energiereiche Verbindungen (z.B. Glucose, Saccharose) die Sulfonsäure-Aufnahme nicht beeinflussen (Tab.15). Nach den Ergebnissen der Präinkubation im Phosphatpuffer (Tab.14) erscheint es vielmehr so, als ob die Aktivität des Aufnahmesystems über die aktuelle Verfügbarkeit an Phosphationen innerhalb der Zelle reguliert würde - und damit möglicherweise über eine Art Phosphorylierungs/Dephosphorylierungs-Mechanismus.

Die Phosphatstimulierung von Enzymen ist auch von anderen Fällen bekannt und kann durch zahlreiche Möglichkeiten erklärt werden, z.B. über die Erleichterung enzymatischer Phosphorylierungen durch Proteinkinasen oder die Hemmung zellulärer Phosphatasen. Den Schlüssel zur Klärung des Problemkreises könnte die Wirkung von Aminoäthylphosphat, Pyrophosphat und diverser metabolischer Inhibitoren auf die ÄSS/Taurin-Aufnahme ergeben (Tab.12,15,18): So stimulierte Aminoäthylphosphat (ein Phosphataseinhibitor) die ÄSS-Aufnahme sichtlich, während Pyrophosphat als Phosphatantagonist, ATP-Analogon und ATPase-Inhibitor Aufnahmehemmung zeigte. Gleichzeitig senkten zwei Hemmstoffe der Proteinphosphorylierung in tierischen Systemen (PMSF und Äthanol) die Aufnahmeraten für ÄSS/Taurin in Chlorella fusca. PMSF, das über die Sulfonierung aktiver Serin- und Tyrosingruppen die Stellen in Proteinen zu blockieren vermag, an denen Phosphorylierungen/Umsetzungen stattfinden können, wirkte dabei besonders aufnahmehemmend. Äthanol, das nach (161) u.a. Proteinkinase stimulierte Transportprozesse am Sarcoplasmatischen Reticulum stören kann, wirkte dagegen hier wie dort nur in höheren Konzentrationen auf die jeweiligen Aufnahmeprozesse ein.

Insgesamt gesehen, scheinen zahlreiche Versuchsergebnisse darauf hinzudeuten, daß der Aktivitätsstatus der Sulfonsäure-Permease über die Beteiligung eines Phosphorylierungs/Dephosphorylierungs-Mechanismus reguliert sein könnte. Nach dieser Hypothese würde das Aufnahmesystem ÄSS/Taurin beispielsweise nur dann binden, wenn es im phosphorylierten Status vorliegt (wie es früher schon im Falle der elektrogenen Chloridpumpe von Acetabularia beschrieben wurde (139)). In diesem Modell würde also die Substrataffinität über einen Alles-oder-Nichts-Mechanismus reguliert ("Aktivitätsstatus").

Daneben könnte diese Hypothese auch dazu beitragen, den Aufnahmemechanismus der Sulfonsäure-Permease zu klären.

Dieser **Aufnahmemechanismus** konnte aufgrund der bisher erzielten Ergebnisse nicht eindeutig geklärt werden. Die vorhandenen Daten erlauben jedoch die Wahl zwischen zwei Möglichkeiten:

- 1- Primärer aktiver Transport durch eine ATP-abhängige elektrogene Pumpe (siehe Acetabularia - (139))
- 2- "Chemiosmotischer" sekundärer Transport, der an einen Protonengradienten im Plasmalemma gebunden ist

Allerdings geben sowohl die unterschiedlichen Aktionen von CCCP und DCCD als auch das Fehlen meßbarer pH-Veränderungen im Medium bei ÄSS-Aufnahmeprozessen einen Hinweis auf den möglichen Transportmechanismus.

Laut Literatur stellt ein **primärer aktiver Aufnahmemechanismus** durch eine ATP-getriebene Pumpe eher einen Sonderfall in höheren Organismen dar (Möglichkeit 1). Die bevorzugte treibende Kraft für Stoffaufnahmen in die Zelle scheint hier i.a. gemäß MITCHELLs chemiosmotischer Theorie ein zuvor ausgebildeter Protonengradient zu sein (Möglichkeit 2). Der primäre Transportprozeß durch Zellmembranen von Algen, Pilzen und höheren Pflanzen wäre damit ein elektrogener Protonentransport, der durch eine nach draußen gerichtete ATP-getriebene Protonenpumpe bewirkt wird. An diesen elektrochemischen Protonengradienten sind erst sekundär die protonenabhängigen Cotransportprozesse für Zucker, Aminosäuren und anorganische Ionen gekoppelt (160, 167, 175). Energielieferant ist neben dem künstlich erzeugten pH-Gradienten auch das Membranpotential selbst, v.a. dann wenn äußerer pH und Zell-pH praktisch gleich sind.

Chemiosmotischer Transport ist damit an das Vorhandensein von Protonengradienten im Plasmalemma gebunden, die durch entsprechende ATP-getriebene Protonenpumpen aufrechterhalten werden. Hemmstoffe wie CCCP und DCCD sollten daher primäre und sekundäre Transportprozesse in unterschiedlichem Maße angreifen (s.o.):

- DCCD, das spezifisch protonentranslozierende ATPasen hemmt, wirkt um den Faktor 10 weniger aufnahmehemmend für Sulfonate (ÄSS/Taurin) als für Sulfat
- Auch das Protonophor CCCP hemmte die ÄSS/Taurin-Aufnahme um eine Zehnerpotenz geringer als die Sulfataufnahme (Nach (212) sollten Protonengradienten in Zellmembranen wesentlich empfindlicher gegenüber CCCP reagieren als Thylakoidmembranen)

Beide Ergebnisse deuten darauf hin, daß ÄSS-Taurin-Aufnahme in Chlorella fusca auch bei einer depolarisierten Zellmembran noch stattfinden kann und Sulfonate, abweichend von Möglichkeit 2, auch über eine depolarisierte Membran noch transportierbar sind (im Gegensatz zu Sulfat !).

Auch das Fehlen von pH-Veränderungen im Medium bei $\ddot{A}$ SS-Aufnahme in Chlorella fusca spricht stark für Möglichkeit 1, d.h. für einen Sulfonattransport über einen primären, elektrogenen Aufnahmemechanismus.

So konnte bei Protonen-Cotransport (Zucker, Aminosäuren, anorganische Ionen) in vielen Organismen eine vorübergehende Alkalisierung des Mediums beobachtet werden (34, 106, 145, 160) - ein Effekt, der bei der $\ddot{A}$ SS-Aufnahme in Chlorella fusca bisher noch nicht aufgefunden wurde (nicht aufgezeigt). Einschränkend muß jedoch erwähnt werden, daß diese Mediumalkalisierung nur bei Organismen entdeckt werden konnte, deren Protonenpumpen keine erhöhte Aktivität im Anschluß an den Stofftransport aufwiesen und somit einen sofortigen Ladungsausgleich bewirkten. Nach (34) wiesen beispielsweise von mehreren getesteten Chlorella-Stämmen nur einer die erforderliche, durch Aufnahmeprozesse langsam zu stimulierende Protonenpumpe auf, um eine Alkalisierung des Mediums zweifelsfrei nachweisen zu können. Nähere Untersuchungen sind nötig, um einen Protonen-Cotransport der Sulfonate eindeutig ausschließend zu können, z.B. Bestimmung der kinetischen Parameter $K_{app.}/V_{app.}$ bei wechselnden pH-Werten oder Messungen des Membranpotentials bei Sulfonsäureaufnahme u.v.m. - und um damit eine endgültige Entscheidung zwischen den beiden Transportmechanismen treffen zu können.

Im Gegensatz dazu, kann eine dritte Möglichkeit : Na-Cotransport analog zur Taurinaufnahme bei Bakterien (12) und Tieren (2, 72, 77, 101) mit Sicherheit ausgeschlossen werden, da keine Abhängigkeit der $\ddot{A}$ SS/Taurin-Aufnahme von der herrschenden Natriumionen-Konzentration nachzuweisen war. Weder stoppte der Sulfonattransport in Abwesenheit von Na^+ -Ionen noch erhöhte sich die Aufnahmegeschwindigkeit mit zunehmender Na^+ -Konzentration im Medium (12, 117, 187). Auch der spezifische Hemmstoff Monensin wirkte weitaus geringer hemmend auf die $\ddot{A}$ SS/Taurin-Aufnahme ein als es von anderen Na-Cotransportprozessen bekannt ist.

Als äußerst unwahrscheinlich sind auch Aufnahmemechanismen via Anionen-Antiport (Gegenion: Phosphat) oder über eine Art Phosphotransferasesystem anzusehen. Zwar weist Chlorella fusca Phosphatefflux in erhöhtem Maße auf, jedoch konnte keine Steigerung der Effluxrate bei $\ddot{A}$ SS-Aufnahme gemessen werden. Auch in den Punkten Substratspezifität und Unidirektionalität war keine Ähnlichkeit mit dem bei Chloroplasten beschriebenen Phosphat-Translokator zu erkennen (83).

Das Phosphotransferasesystem andererseits ist nur bei Bakterien und nur bei der Aufnahme gewisser Zuckermoleküle bekannt. Es katalysiert die PEP-abhängige Phosphorylierung einiger Zucker, die nun über den membrangebundenen Teil des Systems hochspezifisch in die Bakterienzelle aufgenommen werden können (155). Es stellt damit ein äußerst ökonomisches Transportsystem dar, das dem zellulären Stoffwechsel bereits phosphorylierte Substratmoleküle bereitzustellen vermag, trotz gezielter Untersuchungen aber nicht in Eucaryonten aufgefunden wurde.

Die bisher erzielten Ergebnisse und Überlegungen zum Mechanismus des Sulfonat-transportes in Chlorella fusca sollen nun in Form eines Modells zusammengefaßt werden (siehe auch (159)).

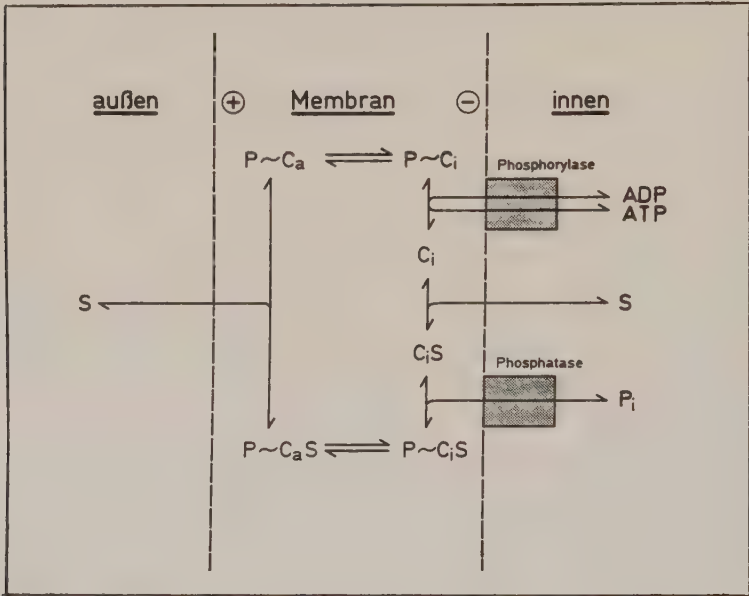


Abb.53: Vereinfachtes Modell des Sulfonattransportes in Chlorella fusca

Es beinhaltet zwei Zustände des Carriers (= Transportprotein) C_a und C_i , und mehrere Gleichgewichtskonstanten, die den Aufnahme-prozeß teils spannungsabhängig (infolge der Bewegung geladener Teilchen durch die Membran), teils spannungsunabhängig (Anbindung/Dissoziation des Substrats vom Carriermolekül oder Phosphorylierung/Dephosphorylierung des Transportproteins) beschreiben.

In dieser Form stimmt das Modell mit folgenden Annahmen überein:

- 1- Der Carrier liegt in zwei (Konformations-)Zuständen vor
 - a) als C_i ist er zum intracellulären Raum gerichtet
 - b) als C_a ist er zum extracellulären Raum gerichtet
- 2- Energiezufuhr ("Aktivierung des Carriers) erfolgt in Form einer Phosphorylierung
- 3- Nur phosphorylierte Stadien des Carriers werden transportiert

- 4- Nur im phosphorylierten Status vermag der Carrier Substrat zu binden/zu transportieren
- 5- Rasche Dephosphorylierung nach der Rückkehr verhindert die Rückreaktion - erst dann erfolgt die Substratabgabe
- 6- Phosphorylierung und Dephosphorylierung finden nur an der Innenseite statt
- 7- Der Energiebedarf (ATP) ist unbekannt
(Die Stöchiometrie zwischen Energieaufwand und Substrat-Translokation wurde daher nicht berücksichtigt)
- 8- Der eigentliche Energieumsatz/verbrauch erfolgt bei der Dephosphorylierung (= Übergang vom hohen zum niedrigen Energiestatus)
- 9- Die Aktivität der Phosphotransferase/Phosphatase wurden von der eigentlichen Transportaktivität des Carriers getrennt eingezeichnet
(Voraussetzung: Das Transportprotein besitzt keine Phosphotransferase/Phosphatase-Eigenschaft, wie z.B. die Na^+/K^+ -abhängige ATPase tierischer Zellen - (48))
- 10- Die Wirkung von Phosphationen wird über eine Erhöhung der Phosphorylierungsrate diskutiert

Die Verifizierung dieses Arbeitsmodell bedarf noch zahlreicher Untersuchungen; unabhängig davon, stellt es jedoch die erste Beschreibung eines neuartigen Taurin(Sulfonsäure-)Aufnahmesystem in photosynthetischen Organismen dar, das abweichend von den bisher bekannten bakteriellen und tierischen Systemen zu arbeiten scheint (2,12,72,77,101).

Überraschenderweise wies unter S-Limitierung auch die procaryotische Blaualge *Anabaena variabilis* ein Taurinaufnahmesystem auf, das deutliche Übereinstimmung zur Sulfonsäurepermease eucaryotischer Grünalgen zeigte (6.3 A - Tab.32). Vor allem in punkto Spezifität (Sulfonsäuren allg.), mangelnde Na^+ -Abhängigkeit und alleiniges Auftreten unter limitierten S-Bedingungen besaß dieses Aufnahmesystem entscheidende Gemeinsamkeiten zu den Verhältnissen bei *Chlorella fusca* unter Sulfat/Schwefel-Mangel - und stand damit im deutlichen Gegensatz zu den Aufnahmeprozessen bei den ebenfalls procaryotischen Bakterien (Na^+ -Cotransport, Taurinaufnahme über ein konstitutives, hochspezifisches Transportsystem)

Diese auffallende Übereinstimmung mag als Indiz dafür gelten, daß die adaptive Fähigkeit zur Sulfonsäureaufnahme (resp. die nachfolgende Metabolisierung) unter S-Mangelbedingungen weit in die Evolution zurückreicht und als - offensichtlich vorteilhafte Eigenschaft bei zahlreichen photosynthetischen Organismen bis in die Jetztzeit erhalten blieb.

Tab.32: Aufnahme und Metabolisierung von Taurin in lebenden Systemen

	Bakterien	Blualgen	Grünalgen		Tiere
	Staphylococcus aureus M (A) Pseudomonas aeruginosa (B) Gram-neg. Bakterium (C)	Anabaena variabilis	Chlorella fusca 211-8b		Säugetierzellen (Ratte, Maus, Mensch)
			System A	System B	
<u>1. Aufnahme</u> Auftreten des Aufnahmesystems	konstitutiv (A)	vermutlich wie bei System A (Chlorella fusca)	Derepression unter Sulfat/S-Mangel	Derepression unter N-Mangelbedingungen	konstitutiv
Spezifität des Aufnahmesystems	Taurin, Hypotaurin (A) Nicht: β -Alanin, Aminosäuren	Sulfonsäuren Nicht: β -Alanin, Aminosäuren	Sulfonsäuren Aminoäthylsulfat Nicht: β -Alanin, Aminosäuren	Aminosäuren einschl. β -Alanin Nicht: Sulfonate	Taurin, Hypotaurin, β -Alanin Nicht: α -Alanin, Gly, Leu, N-Acetyltaurin, 2-Hydroxyäthansulfonsäure
	(eigenständiges) Taurinaufnahmesystem	Sulfonsäure-Aufnahmesystem	Generelles Sulfonsäure-Aufnahmesystem	Generelles Aminosäure-Aufnahmesystem	β -Aminosäure-Aufnahmesystem
Mechanismus der Aufnahme	Na^+ -abhängig	unbekannt (nicht Na^+ -abhängig)	unbekannt (kein Na-Cotransport)	unbekannt (H^+ -Cotransport ?)	Na^+ -abhängig
<u>2. Metabolisierung</u> Auftreten	Induktion unter Mangelbedingungen (B) (C)	vermutlich wie bei System A (Chlorella fusca)	Derepression unter Sulfat/S-Mangel-Bedingungen	keine Metabolisierung	i.a. keine Metabolisierung
Reaktionsmechanismus	Abbau in 2 Stufen: 1. Schritt: Transaminierung (B) bzw. oxidative Deaminierung (C) zu Sulfoacetaldehyd 2. Schritt: Spaltung des Sulfoacetaldehyds zu Acetat und Sulfid	(vermutlich Reduktion zu Mercaptanen und hydrolytische Spaltung der C-S Bindung	oxidative (hydrolytische) Spaltung der C-S Bindung	—	Sonderfall: Reduktive Desaminierung zu 2-Hydroxyäthansulfonsäure

Versuchsbedingungen siehe 6.1-6.3, 7.2-7.3, 7.10 . Literatur (12, 72, 77, 107-110, 177-179, 188) .

Taurin wurde in Chlorella fusca aber nicht nur durch die bisher besprochene Sulfonsäurepermease (S-Mangelbedingungen) aufgenommen sondern, wenn auch mit verminderter Intensität, durch ein zweites klar davon unterschiedenes System.

Zur Erinnerung: Die bisherige Untersuchung zur Taurinaufnahme in Chlorella fusca wurde ausschließlich mit Hilfe ÄSS/Taurin-kultivierter Algen durchgeführt und erlaubte daher "nur" die Charakterisierung einer Taurinpermease unter diesen speziellen Kulturbedingungen. ÄSS- und Taurinaufnahme traten dabei gekoppelt auf und wurden als parallele Funktionen eines gemeinsamen (generellen) Sulfonsäure-Aufnahmesystems angesehen.

Kultivierte man dagegen Chlorella fusca unter **N-Limitierung** bei ausreichender Sulfatversorgung, so fand zwar Taurinaufnahme nicht aber ÄSS-Aufnahme statt. Es lag nahe, den Grund für diese "Entkopplung" in der besonderen Struktur Taurins als β -Aminosulfonsäure zu sehen, die von der Alge wechselweise als Sulfonsäure oder als Aminosäure gelesen werden kann.

Der letztere Aufnahmemodus (" **β -Aminosäure**") unterschied sich in vielen Punkten von der bisher besprochenen Aufnahme als Sulfonsäure (Kap.5/6, Tab.31/32) : So wurde die Taurinaufnahme von allen getesteten α -und β -Aminosäuren mit Ausnahme Lysins gehemmt, während Sulfonsäuren ohne Aminogruppenfunktion keine Beeinflussung der Aufnahme prozeße zeigten. Offensichtlich stellte also die Sulfonsäuregruppe keine strukturelle Voraussetzung für die Interaktion mit dem unter N-Mangel neu ausgebildeten Transportsystem dar. Umgekehrt war die Aufnahmehemmung durch alle Aminosäuren in etwa gleich stark und äußerst unspezifisch.

Die Versuchsergebnisse sprechen damit für eine Aufnahme Taurins als β -Aminosäure über ein **generelles Aminosäure-Aufnahmesystem**, das wie von anderen Organismen beschrieben, als spezifische Antwort auf N-Limitierung ausgebildet werden kann (60, 92, 144). Nicht alle dieser Transportsysteme waren jedoch in der Lage außer α -Aminosäuren auch β -substituierte Verbindungen aufzunehmen: So vermag z.B. auch unter scharfen N-Mangelbedingungen Taurin nicht in die Zellen der Alge Platymonas einzudringen (siehe 144), während andere Organismen α -und β -Aminosäuren gleich gut aufnehmen und erst höhere Homologa nicht mehr als Substrate akzeptieren (60). (Anscheinend toleriert die Substraterkennungsregion in den meisten Fällen nur einen bestimmten Abstand zwischen Amino-und Carboxylgruppe, um diese Verbindung noch als "Aminosäure" erkennen zu können).

Die Aminosulfonsäure Taurin weist allerdings neben der β -Aminosäurefunktion noch einen weiteren strukturellen Unterschied zu den üblichen Aminosäuren auf, der die Aufnahmegeschwindigkeit beeinflussen sollte: **Die fremdartige Säuregruppe** (Abb.51). Kompetitionsversuche zeigten jedoch, daß trotz sterischer Unterschiede zwischen Carboxyl-und Sulfonatgruppe, Taurin als "Aminosäure" aufgenommen wird und seine Aufnahme von α -und β -Aminosäuren gleichermaßen gehemmt wurde. Damit scheint die Aminogruppe die weitaus wichtigere funktionelle Gruppe zur Erkennung/Bindung des Substrates an den Aminosäure-Carrier darzustellen.

Andere Daten sprechen dennoch dafür, daß dieser Transportvorgang nur als relativ ineffektive Seitenfunktion der unter N-Mangel entwickelten Aminosäure-Permease anzusehen ist, aus der sich der schlechte Km-Wert (1.1 mM) bzw. die geringe Beeinflussung der Aufnahme prozeße durch Taurin selbst erklären lassen (6.1.3).

Ein wichtiges Versuchsergebnis war auch die gezeigte pH-Abhängigkeit und das pH-Optimum der Taurinaufnahme bei 4.8 (protonentreibende Kraft maximal), das einen Protonen-Cotransport der Aminosäuren in Chlorella fusca wahrscheinlich macht, wie es für eucaryotische Organismen üblich zu sein scheint (160).

Abschließend sollte jedoch darauf hingewiesen werden, daß sich alle Aussagen über die Aufnahme Taurins als β -Aminosäure nur auf das generelle Aminosäure-Aufnahmesystem unter N-Limitierung beziehen. Die Frage nach einer konstitutiven Aminosäure-Permease in Chlorella fusca muß dagegen verneint werden, da Taurin unter Kultivation im SL-1 Medium (d.h. bei normaler N-Versorgung) nicht von der Alge aufgenommen wird. Vorversuche lassen aber auf die Gegenwart spezifischer Transportsysteme für die Aminosäuren L-Cystein und L-Methionin schließen, die beide keine Transportkapazität für Taurin aufweisen.

Im Gegensatz dazu, besitzt Lemna minor (6.3 A) ein konstitutives Aminosäure-Aufnahmesystem, das Taurin trotz ausreichender Versorgung mit NH_4NO_3 (+Sulfat) aus dem Kulturmedium aufnimmt. Kompetitionsversuche zeigten ferner auf, daß fast alle der getesteten Aminosäuren, einschl. β -Alanins, die Taurinaufnahme der Pflanze zu 80-90 % hemmten. Auch die pH-Abhängigkeit der Taurinaufnahme und das pH-Optimum bei pH 5.5 ähnelte den Verhältnissen bei Chlorella fusca. Andererseits bewirkte Taurin bei Lemna minor ab 0.04 mM Konzentration im Medium über noch unbekannte Prozesse eine vollständige Wachstumshemmung (3.2), die auch durch 10-fache Gaben von z.B. β -Alanin nicht aufzuheben war.

Abweichend davon, kann Chlorella fusca in Gegenwart von Taurin ausgezeichnet wachsen und es als S-Quelle verwerten. Bei Kultivation auf Taurin als einziger N-Quelle konnte dagegen nur äußerst geringes Algenwachstum festgestellt werden. Das aufgenommene Taurin scheint damit (ähnlich wie die Aminosäure β -Alanin) in N-Mangel-Kulturen nicht weiter abgebaut/metabolisiert zu werden.

Auch andere der zugesetzten Aminoverbindungen, wie z.B. primäre Amine, dienen Chlorella fusca nicht als N-Quelle, so daß die Alge anscheinend (im Gegensatz zur großen Variabilität bei S-Mangelbedingungen) nur eine äußerst geringe Zahl N-haltiger Verbindungen als verwertbare N-Quelle heranziehen kann. Nach Tab.22 zeigte die Alge nur auf den entsprechenden Aminosäuren (Alanin, Glycin) gutes Wachstum, ein Indiz dafür, daß sie den in der Verbindung enthaltenen Stickstoff freisetzen und für das Wachstum verwerten kann.

Taurinaufnahme unter N-Mangelbedingungen stellt damit ein typisches Beispiel für die Unspezifität eines Aufnahmesystems dar, das den Transport nicht metabolisierbarer Verbindungen miteinschließt, sofern sie nur strukturelle Verwandtschaften zu verwertbaren Substanzen aufweisen.

2.) Diskussion der Metabolisierungsprozesse

Der letzte Befund diente als Ausgangspunkt für die Untersuchung sulfonsäure-(taurin-)abbauender Prozesse in Chlorella fusca.

Detaillierte Abbaustudien von Taurin gab es bisher v.a. von diversen Bakterien und Pilzen. In beiden Gruppen wurde Taurin zunächst desaminiert und die daraus entstehende Zwischenverbindung sekundär zu Sulfit/Sulfat und einem organischem C-Rest gespalten (siehe Einleitung). Heterotrophe Organismen können Taurin so gleichzeitig als C,S- und N-Quelle nutzen.

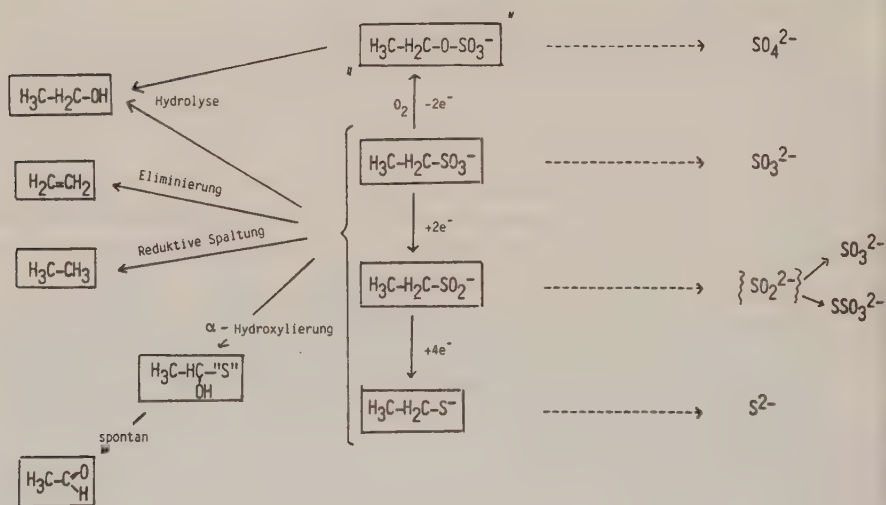
Im Gegensatz dazu, vermag Chlorella fusca 211-8b nur den in der Sulfonsäure enthaltenen Schwefel zu nutzen, nicht jedoch den in der Aminogruppe gebundenen Stickstoff - ein indirekter Beweis dafür, daß der Abbau dieser Verbindung nicht am aktivierten C-NH₂-Ende sondern an der C-S Bindung selbst erfolgen muß. Um trotzdem jeden Seitengruppeneffekt ausschließen zu können, wurde zunächst mit ³⁵S-markierter Äthansulfonsäure gearbeitet. Das Fehlen funktioneller Gruppen im Molekül dieser n-Alkansulfonsäure machte einen primären enzymatischen Angriff an der C-S Bindung wahrscheinlich und sollte so die Ableitung allgemeingültiger Reaktionsmechanismen ermöglichen.

Theoretisch gesehen, ergeben sich analog zu den in der Einleitung aufgezählten Abbau/Reaktionsmechanismen aliphatischer und aromatischer Sulfonsäuren folgende Möglichkeiten zum ÄSS-Abbau in Chlorella fusca (Abb.54) :

- 1- Hydrolyse zum entsprechenden Alkohol und Sulfit
- 2- Oxidative Spaltung zum entsprechenden Alkohol und Sulfat (möglicherweise unter Einschub eines Sauerstoffatoms zwischen die C-S Bindung und Hydrolyse des entstehenden Sulfatesters)
- 3- Reduktive Spaltung zum entsprechenden Alkan (208) (analog zur Spaltung aliphatischer Phosphonate (39, 51))
- 4- Eliminierungsreaktion zum entsprechenden Alken
- 5- α -Hydroxylierung: Oxidation des sulfonierten α -C-Atoms zum entsprechenden α -hydroxylierten Produkt und anschließende spontane Spaltung zu Aldehyd und Sulfit (192)
- 6- Reduktion der Sulfonsäure zum entsprechenden Mercaptan und Abspaltung der Thiolgruppe als H₂S

Die Metabolisierungsversuche in 7.1 zeigten auf, daß ³⁵S-Äthansulfonsäure in den Zellen Chlorella fusca rasch abgebaut und die ³⁵S-Markierung in den verschiedensten S-Metaboliten wiedergefunden werden konnte: Sulfat, Glutathion, Cystein, Methionin und Sulfolipide.

Abb.54: Mögliche Reaktionsmechanismen zum Abbau von Äthansulfonat
in *Chlorella fusca*



So lag nach einer Stunde Inkubation in ^{35}S -ÄSS der Hauptteil der aufgenommenen Radioaktivität nicht mehr in Form der ursprünglich eingesetzten Sulfonsäure vor sondern als ^{35}S -Sulfat. Sulfat war auch das erste nachweisbare ^{35}S -markierte Produkt, das 0.5 Minuten nach Inkubation mit Äthansulfonsäure dünn-schichtchromatographisch aufgezeigt werden konnte. Andere Kurzzeitprodukte wie z.B. Sulfit, Äthylmercaptan wurden dagegen nicht entdeckt (7.4).

Die Inkubation mit ^{35}S -Taurin ergab ähnliche Ergebnisse: Wiederum war Sulfat nach einstündiger Inkubation das in den Zellen vorliegende ^{35}S -Hauptprodukt; gleichzeitig war es bei Kurzzeitanalysen das erste nachweisbare Abbauprodukt dieser Sulfonsäure.

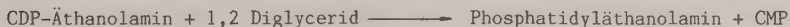
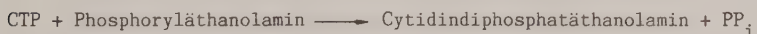
Folgerung: Offensichtlich stellte also die Bildung von Sulfat aus ÄSS/Taurin einer der ersten Schritte der Sulfonsäure-Degradation dar und der Abbau beider Sulfonsäuren wies trotz Aminogruppe große Übereinstimmung auf.

Es schien deshalb legitim, die weiteren Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus, v.a. zur chemischen Natur des beim Sulfonsäureabbau entstehenden C-Restes, mit Hilfe ^3H -markierten Taurins durchzuführen, das im Gegensatz zu ^3H -ÄSS käuflich zu erwerben war.

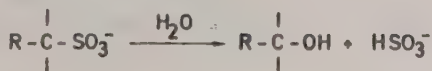
Nach einstündiger Inkubation im WARBURG-Apparat war das eingesetzte ^3H -Taurin nur noch in relativ geringem Umfang in der Zelle nachweisbar: Der Großteil der aufgenommenen Radioaktivität teilte sich vielmehr zwischen den Fraktionen Aminoäthylphosphat (AEP) und Phosphatidyläthanolamin auf. Daneben wurden erhebliche Anteile ^3H -markierter Radioaktivität auf Aminbasis (Äthanolamin ?) festgestellt. Auch die Kurzzeitanalyse bestätigte die Bildung ^3H -markierter Amine.

Obwohl dieses ^3H -Amin bisher noch nicht eindeutig identifiziert werden konnte, spricht vieles für die Entstehung von Äthanolamin - z.B. der in 7.2.2 geführte Nachweis von Phosphatidyläthanolamin (die einzige ^3H -markierte Lipidbande nach Inkubation mit ^3H -Taurin). Dieses polare Lipid kann im Stoffwechsel der Alge auf mehrere Arten gebildet werden : So wurden neben der Reaktion CDP-Äthanolamins mit einem 1,2 Diglycerid auch Transphosphatidylierungen mit Äthanolamin und mit Aminoäthylphosphat beschrieben (99). Über Taurinabbau gebildetes ^3H -Äthanolamin könnte daher leicht das üblicherweise aus der Aminosäure Serin gebildete Produkt (Aminosäure-Decarboxylase) ersetzen.

Auch die Anwesenheit Aminoäthylphosphats in der Zelle kann als Zwischenprodukt dieses Stoffwechselweges erklärt werden. Gleichzeitig darf jedoch eine Bildung AEPs aus komplexeren ^3H -Verbindungen aufgrund degradierender Aufschlußbedingungen (Hitze, Säure) nicht vollständig ausgeschlossen werden.



Aufgrund der insgesamt gebildeten Reaktionsprodukte können erste Aussagen über den molekularen Mechanismus der enzymatischen Desulfonierung getroffen werden. So ließe sich als Reaktionsmechanismus v.a. eine Art hydrolytische Spaltung der C-S Bindung diskutieren, bei der Sulfid/Sulfat und der entsprechende Alkohol gebildet werden (siehe auch Abb.54):



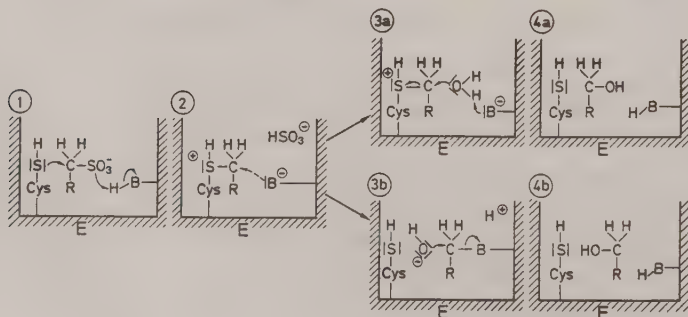
Der Wirkungsmechanismus einer solchen "Desulfonase" wäre damit analog zur nicht-enzymatischen Hydrolyse unter stark alkalischen Bedingungen, bei der ein nucleophiler Angriff des Hydroxylions am α -C-Atom nach Art einer S_N2 -Reaktion die Spaltung der C-S Bindung einleitet (146, 203).

Voraussetzung dieses S_N2 -Reaktionstyps ist die polare Atombindung zwischen den Bindungspartnern C und S (S elektronegativer), die einen Austritt der SO_3^- -Gruppe unter Mitnahme des gemeinsamen Bindungselektronenpaars ermöglicht. Auch die Art der vorliegenden Austrittsgruppe (solvatisiertes Anion, Ladung mesomer im System verteilt) erleichtert den Bruch der C-S Bindung in Sulfonsäuren (146). Ein zusätzlicher Effekt auf die Effizienz der Desulfonierungsreaktion kann auch durch die Anwesenheit elektronegativer Gruppen im Molekül gegeben sein (-I-Effekt), die eine stärkere Polarisierung der ursprünglichen C-S Bindung bewirken und damit einen nucleophilen Angriff am C-Atom erleichtern (Erhöhung der Reaktivität).

Überträgt man diese Überlegungen auf die Wirkungsweise einer enzymatischen Desulfonierung, so muß im entsprechenden Enzym ("Desulfonase") die Anwesenheit gewisser struktureller Gegebenheiten gefordert werden, z.B. das Auftreten von zumindestens einer nucleophilen Gruppe mit Elektronendonorkapazität im aktiven Zentrum (OH- bzw. SH-Gruppe). Eine zweite (basische) Gruppierung sollte dagegen die Abspaltung der Sulfonatgruppe erleichtern und durch nucleophile Übernahme des Substrates ("Walden-Umkehr") die Katalyse kooperativ unterstützen (siehe (85) und die Wirkungsweise von Thiol-Imidazol-Systemen).

Abb.55 zeigt schematisch den hypothetischen Reaktionsmechanismus eines solchen Enzyms in Chlorella fusca auf (analog konzipiert zur Deacylierungsreaktion von Carbonsäureestern (85) bzw. der Wirkungsweise gewisser Proteasen und Esterasen).

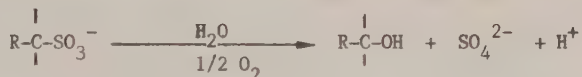
Abb.55: Modell zum Reaktionsmechanismus des Sulfonsäureabbaus in Chlorella fusca (hydrolytische Spaltung der C-S Bindung)



Die Verifizierung dieses Modells bedarf noch zahlreicher Untersuchungen; so blieb z.B. unbekannt, ob die relativ reaktionsträgen Sulfonsäuren zu Beginn des enzymatischen Abbaus aktiviert werden und daher (abweichend zu Abb.55) etwa in phosphorylierter Form die Desulfonierungsreaktion eingehen.

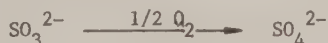
Problematisch blieb auch die Rolle **Sulfits** bei der Hydrolyse von C-S Bindungen, da es mit Hilfe der Conway-Technik nicht möglich war, säurelabile Radioaktivität im Anschluß an die Inkubation intakter Zellen mit ^{35}S -ÄSS/Taurin nachzuweisen. Dies könnte für einen Reaktionsmechanismus in modifizierter Form sprechen (s.u.) oder für die Anwesenheit einer hochaktiven Sulfitoxidase, assoziiert an den Desulfonase-Komplex der Zelle.

Unter Berücksichtigung dieses Einwandes ergibt sich die Notwendigkeit, zusätzlich zur hydrolytischen Spaltung der C-S Bindung noch einen oxidativen Schritt in die Gesamtreaktion miteinzubeziehen :

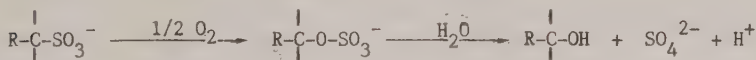


Über die enzymatische Natur dieses oxidativen Schrittes gibt es mehrere Denkmöglichkeiten:

- 1- Wirkungsweise einer nachgeschalteten Sulfitoxidase



- 2- Wirkungsweise einer vor/beigeschalteten Oxygenase



- 3- Wirkungsweise einer vor/beigeschalteten α -Hydroxylase



Für **Möglichkeit 1** ("Wirkungsweise einer nachgeschalteten Sulfitoxidase") spricht, daß die Anwesenheit einer membrangebundenen Sulfitoxidase in Chlorella fusca bereits nachgewiesen, das Enzym charakterisiert werden konnte (151). Weitere Untersuchungen zeigten allerdings keine signifikante Erhöhung der Enzymaktivität bei Kultivation der Algen auf Sulfonsäuren als einziger S-Quelle.

Auch das Unvermögen, enzymatische Desulfonierungen im zellfreien System (7.8) nachzuweisen, könnte unter Umständen diese Annahme unterstützen. So vermag nach (55) Sulfat die Aktion gewisser Arylsulfatasen bei sauren Reaktionsbedingungen zu hemmen (2.6.6), indem es in Form des primären Abspaltungsproduktes HSO_4^- die Vorwärtsreaktion des Enzyms blockiert (Bildung eines Enzym/ HSO_4^- -Komplex). Auf die enzymatische Desulfonierung übertragen: Möglicherweise blockiert auch HSO_3^- als primäres Abspaltungsprodukt (Abb.55) die weitere Enzymaktivität im zellfreien System - wenn es sich aufgrund des Zellaufschlusses und der daraus resultierenden Zerstörung von Membrankompartimenten (Abdissoziation der Sulfit-oxidase ?) zu akkumulieren beginnt.

Zu **Möglichkeit 2** ("Wirkungsweise einer Oxygenase unter Einschub eines O-Atoms zwischen die C-S Bindung") muß einschränkend erwähnt werden, daß bisher aus der Literatur nur O-übertragende Enzyme bekannt sind, die ein Sauerstoffatom zwischen zwei C-Atome einfügen können (37, 143), nicht aber zwischen eine C-S Bindung. Trotzdem wäre dies eine mögliche Reaktion und führte zur Bildung aliphatischer Sulfatester, die nun wie üblich gespalten werden können (55).

Die Frage bleibt allerdings, inwieweit man einen solchen Reaktionstyp noch als "Desulfonierung" bezeichnen sollte - und ob es nicht nötig wäre, von vornherein einen 2-stufigen Reaktionsverlauf (1.Schritt Oxygenase; 2.Schritt Alkylsulfatase) anzunehmen. Möglicherweise besitzt aber auch die hier vorausgesetzte Sulfatase eine genügend hohe Unspezifität, um Alkylsulfonsäuren gemäß Möglichkeit 1 als Substrate zu akzeptieren.

Wichtig: Auch im Falle einer stellvertretend aktiven Sulfatase bleibt Abb.55 als Modell des Reaktionsmechanismus ("Desulfonierung", "Desulfatierung") gültig, nur daß anstelle einer C-S Bindung (Sulfonsäure) eine C-O-S Bindung (Sulfatester) zu spalten wäre. Auch die Überlegungen zum Wirkungsmechanismus einer alkalischen Hydrolyse, d.h. dem primären nucleophilen Angriff am C-Atom einer polarisierten Atombindung bleiben nach wie vor zutreffend. Sie können nach (55) uneingeschränkt auf aliphatische Sulfatester übertragen werden, da das überbrückende O-Atom einer C-O-S Esterbindung vermittelt einer dp- π -Bindung in die SO_3 -Gruppe miteinbezogen wurde und daher ein enzymatischer Angriff nur an diesem C-Atom erfolgen kann. Austrittsgruppe ist das äußerst energiearme Sulfatanion.

Möglichkeit 3 (Wirkungsweise einer α -Hydroxylase: Bildung eines α -hydroxylierten Produktes und Spaltung der C-S Bindung unter Austritt von SO_3) wurde bereits in abgewandelter Form bei der Degradation von $\text{C}_4\text{-C}_8$ n-Alkan-1-sulfonsäuren durch Bakterien beschrieben (siehe 192). In diesen Organismen wiesen allerdings die Autoren eine spontane Spaltung des α -hydroxylierten Reaktionsproduktes zu Sulfit und einem Aldehyd nach ("Sulfitadditionsprodukt" (146)). Nimmt man jedoch eine

enzymatisch unterstützte Spaltung der C-S Bindung unter Verlust des gemeinsamen Elektronenpaares für die Sulfonylgruppe an, dann würden als Reaktionsprodukte SO_3 (das schnell mit Wasser zu H_2SO_4 weiterreagieren kann) und der entsprechende Alkohol entstehen. Nichtsdestotrotz erscheint diese Möglichkeit aufgrund der vorgegebenen energetischen und strukturellen Verhältnisse am wenigsten wahrscheinlich.

Eine Überprüfung der angeführten Möglichkeiten 1)-3) wäre u.a. durch Verwendung ^{18}O -markierten Wassers denkbar, wobei sich die ^{18}O -Markierung später entweder im Sulfat- oder im Alkoholmolekül nachweisen lassen sollte.

Die Hauptschwierigkeit der Untersuchungen und der endgültigen Zuordnung des Reaktionsmechanismus liegt allerdings in dem mehrfach gescheiterten Unterfangen, diese Reaktion auch im zellfreien System nachzuvollziehen (7.8). Gründe für dieses Mißlingen könnten u.a. sein:

- Fehlen eines essentiellen Co-Faktors
- Aufhebung der ursprünglichen Kompartimentierung und Freisetzung gewisser Inhibitoren
- Zerstörung der räumlichen Strukturen, v.a. der zellulären Membranen, an denen Sulfonsäureabbau geordnet ablaufen kann
- Sulfonsäuren werden bereits bei der Aufnahme oxidativ-hydrolytisch gespalten und können daher im zellfreien System nicht abgebaut werden (siehe 31).

Obwohl die subzelluläre Lokalisation der Sulfonsäure-Degradation nicht aufgeklärt werden konnte, spricht jedoch der relativ gleichbleibende Anteil von 10 - 15 % Sulfonsäure im Zellinnern nach Inkubation mit ^{35}S -ÄSS/Taurin gegen einen gleichzeitigen Ablauf von Transport und oxidativer Spaltung der C-S Bindung.

Ein kurzer Vergleich mit dem Mechanismus des ÄSS-Abbaus in der Blaualge Anabaena variabilis soll diesen Teil der Besprechung abschließen.

Wie in 7.10 gezeigt, weist die Blaualge nach Inkubation mit ^{35}S -ÄSS erhebliche Anteile an flüchtiger Radioaktivität auf Mercaptanbasis - sowie an Zinkacetat adsorbierbares ^{35}S -Sulfid auf (im Gegensatz zur bisher besprochenen Grünalge). Möglicherweise besitzt daher diese Blaualge ein von Chlorella fusca abweichendes Sulfonsäure-Abbauschema, nämlich die Reduktion der aufgenommenen Sulfonsäure zum Mercaptan und Spaltung der C-S Bindung zu H_2S und dem entsprechenden Alkohol auf diesem Reduktionsniveau.

Damit wäre aber ein alternativer Weg der Sulfatreduktion mit kovalent gebundenen Zwischenstufen (ungleich Thiosulfonaten) in photosynthetisch aktiven Organismen beschrieben - und erstmalig ein in-vivo Nachweis für gebundene Sulfatreduktion, abweichend vom üblichen Schema, geführt.

3.) Diskussion der Regulationsprozeße

ÄSS/Taurin unterstützten das Wachstum Chlorella fuscas als einzige S-Quelle, da sie von dieser Grünalge spezifisch aufgenommen und nachfolgend metabolisiert werden können - unter Freisetzung des in der Verbindung enthaltenen Schwefels.

Beide Fähigkeiten wurden zunächst anhand ÄSS/Taurin-gewachsener Algenkulturen aufgezeigt und verifiziert: Alle sulfonatgezogenen Kulturen nahmen Sulfonsäuren in ähnlicher Größenordnung auf wie ursprünglich Sulfat und metabolisierten sie innerhalb der Zelle zu Sulfat und davon abgeleiteten S-haltigen Folgeprodukten (Metaboliten des organischen C-Restes).

Die Überprüfung dieser Eigenschaften mit Hilfe sulfatgewachsener Algen verlief negativ, ebenso in sulfatversetzten Algenkulturen. In beiden Fällen konnte weder ÄSS/Taurin-Aufnahme noch Abbau der aufgenommenen Substanzen nachgewiesen werden. Andererseits zeigten in S-freiem Medium (bzw. auf Cystein/Methionin) kultivierte Algen ähnliche Fähigkeiten wie die Sulfonatkulturen.

Weitere Versuche klärten dieses zunächst recht widersprüchliche Bild auf dem Niveau der Sulfonsäureaufnahme:

- ÄSS/Taurinaufnahme ist nicht konstitutiv
- Die Ausbildung dieser Fähigkeit erfolgt unabhängig von der Gegenwart des jeweiligen Substrates im Medium
- Die Entwicklung des Sulfonattransportes in Chlorella fusca findet nur in Abwesenheit von Sulfationen statt (unabhängig von der gleichzeitig angebotenen alternativen Schwefelquelle)
- Mit Sulfat versetzte Kulturen weisen ebenso wie original Sulfatkulturen keinen Sulfonattransport auf

Aufgrund dieser Versuchsergebnisse war es möglich, das hinter der Ausbildung des Sulfonsäure-Aufnahmesystems stehende Prinzip zu identifizieren: Als eine Antwort auf herrschende Sulfat/Schwefel-Mangelbedingungen.

Andere Regulationsfaktoren scheiden aus: Nach Tab.6-9 scheint die Entwicklung des ÄSS/Taurin-Aufnahmesystems in Chlorella fusca weder Substratinduktion noch Folge des Schwefelmangels allein zu sein. Gleichzeitig kann ÄSS/Taurin-Aufnahme auch durch keinen Mangel an reduzierten Schwefelverbindungen bewirkt werden, da selbst Cystein- oder Methionin-Kulturen (mehrfach beschriebene Regulatoren von S-Aufnahme/S-Stoffwechsel) dieses Aufnahmesystem besaßen. Außerdem werden beide S-haltigen Aminosäuren auch in Gegenwart von Sulfat aus dem Medium aufgenommen und Cyst(e)in/Methionin sind nach 4-5 Tagen Wachstum noch gut im Kulturmedium nachweisbar (eigene Vorversuche).

Die Hypothese, daß **Sulfat/Schwefel-Mangel** als internes Signal zur Ausbildung des Sulfonsäure-Aufnahmesystems in Chlorella fusca wirkt, wurde gestützt durch das gleichlaufende Verhalten von ÄSS /Taurinaufnahme und erhöhter Sulfataufnahme. So war bei allen Versuchsansätzen Sulfonsäureaufnahme mit erhöhter Sulfataufnahme korreliert und umgekehrt (Tab.6-9). Gestiegene Sulfataufnahmekapazität wurde daher ausschließlich bei Abwesenheit von Sulfationen im Medium aufgefunden - unabhängig von der angebotenen alternativen Schwefelquelle.

Gesteigerte Sulfataufnahme, bis teilweise auf das 100-fache des Ausgangswertes, stellt aber eine gezielte Antwort auf Sulfatmangelbedingungen dar und wurde bereits von einer Vielzahl photosynthetischer Organismen beschrieben, z.B. bei Cyanobakterien (200), bei Algen (51, 201) und bei höheren Pflanzen (182, 183). Eine Erklärung für dieses Phänomen wurde mehrfach vorgeschlagen, u.a. von Smith (182, 183), der dieses Problem wohl am konsequentesten durchdachte. Anhand der unterschiedlichen Sulfataufnahmeraten in Tabakzellkulturen kam er zu dem Schluß, daß die Sulfataufnahme über die **Größe des intracellulären Sulfatpools** reguliert sein könnte. Die Sulfataufnahme in Zellen mit kleinem Sulfatpool (S-Mangelzellen) sollte daher hoch und in Zellen mit großem Sulfatpool (z.B. in N/Fe-Mangelzellen) eher niedrig sein (siehe Tab.8/9). Zugabe von exogenem Sulfat sollte dagegen die Sulfataufnahme einer Zelle innerhalb kurzer Zeit absenken (siehe Abb.9). Mit anderen Worten: Die aktuelle Sulfataufnahmerate kann als Maß für die Größe des endogenen Sulfatpools einer Zelle herangenommen werden.

Damit liefern die unterschiedlichen Sulfataufnahmeraten bei Kultivation der Alge unter verschiedenen Bedingungen der S-, N- und Fe-Versorgung den Schlüssel (Tab.8/9) zur Aufklärung des **Sulfat/Schwefel-Mangelsignals** in Chlorella fusca: Es handelt sich um den erniedrigten intracellulären Sulfatpool.

Offensichtlich agiert in diesem Fall intracelluläres Sulfat (Poolgröße) bzw. ein davon abgeleiteter Metabolit auf der oxidativen Seite des S-Stoffwechsels (Sulfat-ester ? Sulfolipid ?) nach Art eines niedermolekularen Effektors und metabolischen Repressors, der die Ausbildung von Sulfonsäureaufnahme/erhöhter Sulfataufnahme bei Normalbedingungen reprimiert. Nur unter Mangelbedingungen kann dieser metabolische Block entfernt werden (abgesenkter Sulfatpool), und es kommt zur Derepression beider Aufnahmesysteme in Chlorella fusca.

Aus diesem Grunde zeigten N- bzw. Fe-Mangelkulturen weder ÄSS -Aufnahme noch erhöhte Sulfataufnahme, da beide Phänomene nur als spezifische Antwort auf Sulfat/Schwefel-Mangelbedingungen und nicht als unspezifische Antwort auf Mangelbedingungen aller Art ausgebildet werden. Andererseits können beide Systeme in Cystein/Methionin-Kulturen präsent sein, sofern die Abwesenheit von Sulfationen gewährleistet ist.

Die reduktiven Assimilationsprodukte des Sulfats, L-Cystein bzw. L-Methionin, beeinflussen damit bei Chlorella fusca weder Sulfataufnahme noch die Ausbildung des Sulfonsäure-Aufnahmesystems. Im Gegenteil, Cysteinkulturen zeigten erhöhte Sulfataufnahmeraten und indizierten damit die Anwesenheit eines erniedrigten Sulfatpools in der Zelle.

Dies ist zunächst überraschend, da Cystein und/oder Methionin in den meisten Organismen die Sulfataufnahme sehr wohl beeinflussen. Dies scheint aber indirekt zu geschehen, indem die reduzierten Schwefelverbindungen abgebaut, oxidiert und zur Auffüllung des intracellulären Sulfatpools verwendet werden, z.B. bei Tabakkulturen (183) oder bei Lemna minor (48).

In Chlorella fusca 211-8b zeigten dagegen Cystein/Methionin keine analoge Wirkung und alle diesbezüglichen Regulationsmechanismen waren auf die natürliche S-Quelle Sulfat bezogen. Dieses scheinbare Paradoxon könnte sich v.a. durch limitierte Oxidationskapazitäten der Alge erklären lassen: So scheint Chlorella reduzierte Schwefelverbindungen nur langsam und nicht quantitativ zu Sulfat aufzuoxidierten und kann somit den Sulfatpool in Abwesenheit Sulfats nicht in ausreichenden Maße auffüllen. Damit hat Cystein weder Einfluß auf die Aufnahmesysteme noch auf andere sulfatregulierte Enzymsysteme in der Alge (z.B. auf APS-Sulfotransferase (168)).

Wichtig: Möglicherweise lassen sich über diese artspezifischen Unterschiede in den Oxidationskapazitäten für reduzierte Schwefelverbindungen auch die zahlreichen "Widersprüche" erklären, die bei der Kontrolle von Sulfataufnahme und abgeleiteter Prozesse durch Cystein/Methionin in den verschiedensten Organismen beobachtet wurden (19, 26, 27, 29, 36, 42, 48, 65, 126, 135, 162, 168, 183, 202, 213).

Rückblickend erwies sich damit die Wahl Chlorella fuscas zum Versuchsobjekt als großer Glücksfall, da gerade bei dieser Alge **Regulationsmechanismen des Sulfats** in reiner Form, ohne Beeinflussung durch andere S-Verbindungen untersucht werden können. Auch das Fehlen von Vakuolen (Sulfatspeicher) oder Speicherverbindungen auf der oxidativen Seite (die in die Regulationsprozesse eingreifen könnten) trägt wesentlich dazu bei, die regulative Wirkung des Sulfats so klar und deutlich zu sehen.

Im Nachhinein ist es müßig zu spekulieren, ob diese Form der Regulation primär oder sekundär durch Verlust oxidativer Kapazitäten entstanden ist. Vordergründig erscheint jedoch die Ausschließlichkeit dieses Regulationsprinzips mit zahlreichen ökonomischen Nachteilen behaftet zu sein, da die Zelle Aufnahmekapazitäten für Sulfat und andere S-haltige Verbindungen freihält (in vermehrten Maße synthetisiert), obwohl sie bei ihrem Wachstum auf Cystein/Methionin keine äußeren Mangelsymptome zeigt und daher diese Verbindungen ausreichend gut aufnehmen/metabolisieren muß.

Die Wirkung von Cystein und Methionin auf ÄSS/Sulfataufnahme wurde allerdings auch noch in einem anderen Zusammenhang untersucht: Als direkte Wirkung auf die Aufnahmegeschwindigkeit selbst (5.6.2) bzw. auf die Aufnahmeprozesse generell durch nachträgliche Zugabe zu verschiedenen Algenkulturen (7.1).

Während Methionin keinerlei Beeinflussung der ÄSS/Taurinaufnahme zeigte, muß die unterschiedliche Wirkung von Cystein auf diese Aufnahmeprozesse durch zwei Arten regulativen Eingriffes erklärt werden: So kann die kurzfristige Erhöhung der Sulfonsäure-Aufnahmeraten nach 3 mM Cysteinzugabe ins Medium auf eine zeitweise Belebung des Gesamtstoffwechsels zurückgeführt werden (erhöhte physiologische Tätigkeit der Zelle infolge Anlieferung bereits reduzierter S-Verbindungen, Cystein = Ausgangsprodukt vieler Biosynthesewege). Eine direkte Wirkung von Cystein auf das ÄSS-Aufnahmesystem konnte dagegen nicht aufgezeigt werden (im Gegensatz zur Cysteinwirkung auf die Sulfataufnahme in Chlorella fusca).

Die kinetische Analyse der ÄSS/Taurinaufnahme in Abb.3/4 zeigte einen Zeitraum von ungefähr 2-2.5 Stunden ("lag-Phase"), der zur Ausbildung dieses Phänomens benötigt wurde. Das zeitlich gleichlaufende Verhalten von ÄSS/Taurinaufnahme und erhöhter Sulfataufnahme nach Umsetzung auf Sulfatmangelmedium deutet auf ein gemeinsam zugrundeliegendes Regulationsprinzip hin: Die Entstehung beider Aufnahmesysteme als Folge des abgesunkenen Sulfatpools in der Zelle, was nach Unterschreiten einer kritischen Konzentration zur Derepression entsprechender Transportkapazitäten führte.

Maximale Derepression der Transportkapazitäten für ÄSS/Taurin bzw. für Sulfat wurde allerdings nur im S-Mangelmedium erreicht, wohingegen Sulfonatkulturen beide Aufnahmesysteme auf eine vergleichsweise niedrigere Gleichgewichtslage einregulierten (da bei der nachfolgenden Metabolisierung der Sulfonsäuren in der Zelle Sulfat gebildet wurde).

Cycloheximid, ein bekannter Translationshemmstoff, verhinderte die Ausbildung beider Aufnahmesysteme - ein wichtiges Indiz dafür, daß Proteinbiosynthese bei dieser Entwicklung eine Rolle spielen muß.

Über die Natur des de-novo synthetisierten Proteins kann dagegen nur spekuliert werden. Es kann zunächst keine Aussage darüber getroffen werden, ob es sich um die Neusynthese des gesamten Aufnahmesystems handelt (einschließlich Erkennungs-Translokations-und Energiekopplungseinheit), einer speziellen Aktivierungseinheit (posttranslationale Modifikation des zunächst inaktiven Aufnahmesystems) oder um eine "Processase", die z.B. entsprechende Informationen aus maskierter m-RNA nachträglich freizusetzen vermag.

Die Idee eines Aktivierungsfaktors (Aufnahmesystem bereits präformiert in der Zellmembran) erscheint dabei bestechend: Als kleineres Polypeptid/Protein, das relativ schnell synthetisiert werden kann, ermöglichte es eine rasche Antwort auf Veränderungen der Umwelt, während die Neubildung des gesamten, komplexen Aufnahmesystems mehr Zeit in Anspruch nehmen dürfte ("Notfallmechanismus").

In diesem Zusammenhang sei auch an die Untersuchungsergebnisse des induzierbaren Hexose-Transportsystems in Chlorella vulgaris erinnert. Über Doppelmarkierung konnte damals die Bildung eines einzigen Proteins mit Molekulargewicht 30 000 nachgewiesen werden, das allerdings keine Zuckerbindungsaffinität aufwies (61). Dies war zunächst überraschend. Sollte aber das de-novo synthetisierte Protein eine Art "Aktivierungseinheit" des Zuckeraufnahmesystems darstellen, dann wäre diese fehlende Affinität nur zu erklärlich.

Am Beispiel des in ÄSS-Algen vorliegenden Sulfonsäure-Aufnahmesystems sollen nun einige Denkmöglichkeiten zur nachträglichen "Aktivierung/Stimulierung" von Transportkapazitäten besprochen werden:

So wurde bereits auf die Phosphatstimulierung der ÄSS-Aufnahme hingewiesen und als eine Art Phosphorylierungs/Dephosphorylierungs-Mechanismus des Aufnahmesystems interpretiert. Ein de-novo synthetisierter Aktivierungsfaktor könnte daher z.B. eine Proteinkinase sein, die das System über Phosphorylierung aktiviert (Abb.52), beispielsweise die Affinität für das Substrat erhöht oder die Energieübertragung erst zuläßt.

Noch vorteilhafter erscheint diese Überlegung, nimmt man zusätzlich an, daß auch jene Proteinkinase/Phosphorylase im Sulfatstatus bereits vorhanden ist, aber das Aufnahmesystem nicht aktivieren kann, weil die entsprechende Phosphorylierungsstelle durch eine (Protein/Saccharid)-Sequenz blockiert ist. S-Mangel führt nun zur Derepression einer "Modifikase", die das Aufnahmesystem unter Abspaltung der blockierenden Sequenz in einen Status überführt, der durch Phosphorylierung aktiviert werden kann.

Bei Diskussion der Sulfataufnahme in ÄSS-Algen muß dagegen ein anderer Aspekt der Regulation angesprochen werden, da Chlorella fusca bereits über ein aktives, konstitutives Aufnahmesystem im Sulfatstatus verfügt, das aber bei Sulfatmangel zusätzlich stimuliert werden kann.

Erhöhung der Sulfataufnahmekapazität unter S-Mangelbedingungen kann nach der einschlägigen Literatur durch mehrere Mechanismen bewirkt werden, z.B. Erhöhung der Anzahl (V_{max}) bzw. der Affinität (K_m) vorliegender Transporteinheiten, Synthese neuer hochaffiner Systeme oder allosterische Aktivierung des Aufnahmesystems, etwa durch das Substrat (36, 44, 96, 119).

Nach 5.11 wurde erhöhte Sulfataufnahme in Chlorella fusca durch Beschleunigung der $V_{\max}$ bei höheren Substratkonzentrationen hervorgerufen, während der K_m -Wert gleich blieb. Dieses Aufnahmeverhalten könnte u.a. durch Erhöhung der Anzahl von Transporteinheiten erklärt werden (119). Gleichzeitig läßt das unübliche Verhalten der Sulfataufnahme bei höheren Substratkonzentrationen, sowie die gezeigte pH- und Temperaturabhängigkeit noch eine andere Interpretationsmöglichkeit zu: Die Synthese von Aktivierungseinheiten für die Sulfatpermease, die die Anzahl (allosterisch) aktiver Transporteinheiten erhöht (gleicher K_m -Wert, erhöhter $V_{\max}$).

Strukturelle Voraussetzung für dieses Modell wäre die Existenz einer aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzten Sulfatpermease, deren Einheiten sich im Aufnahme-prozeß gegenseitig allosterisch zu beeinflussen vermögen (siehe 96).

Allosterische Beeinflussung könnte auch die v.a. bei höheren Substratkonzentrationen auftretende starke Beschleunigung der Sulfataufnahme und die daraus resultierenden Unabhängigkeiten des Transportes von herrschenden pH- und Temperaturverhältnissen erklären. Bei steigender Temperatur scheint dagegen ab einem bestimmten Punkt die Dissoziation der Sulfatpermease in kleinere Untereinheiten zu erfolgen (38-43 °C), die nun ihrerseits eine relativ höhere Aktivierungsenergie als vorher benötigen. Diese Annahme würde auch zur Erklärung des relativ hohen Temperaturkoeffizienten oberhalb von 38 °C beitragen, die ein solcher Dissoziationsprozeß vergleichbar zu Denaturierungsvorgängen besitzt (54).

Bei Anwesenheit von Sulfat konnte dagegen keine Kooperativität des Aufnahmesystems festgestellt werden - möglicherweise liegen somit die dafür benötigten Stellen im Sulfatstatus sterisch blockiert vor und erlauben erst nach Entfernung blockierender Sequenzen im Sulfatmangel eine allosterische Interaktion der Untereinheiten.

Nimmt man jetzt als Aktivierungsfaktor bei S-Limitierung eine durch Cycloheximid hemmbare, de-novo zu synthetisierende "Modifikase" an, die eine Abspaltung solcher Sequenzen bewirkt, dann hätte man den Kreis zur gleichzeitig ablaufenden Aktivierung der Sulfonsäure-Aufnahme in Chlorella fusca geschlossen.

Sollte es darüber hinaus auch noch gelingen, identische Sequenzen/Schnittstellen beider Aufnahmesysteme nachweisen zu können, dann wäre eine wichtige Voraussetzung für die koordinierte Regulation der beiden Transportsysteme in Chlorella fusca erfüllt, wie es die zeitlich gleichlaufende Aktivierung/Stimulierung bei S-Mangel zu erfordern scheint.

Die "lag-Phase" von 2.5 Stunden, die zur gleichzeitigen Ausbildung von Sulfonsäureaufnahme/erhöhter Sulfataufnahme in Chlorella fusca benötigt wird, wurde als der Zeitraum interpretiert, in dem der intracelluläre Sulfatpool durch S-verbrauchende metabolische Prozesse bis auf eine kritische Grenze abgesenkt wurde. Das Unterschreiten dieser Grenze setzte eine Fülle von Maßnahmen frei, u.a. auch die eben erwähnte Derepression neuer Transporteinheiten durch de-novo synthetisierte Proteineinheiten.

Dafür sprechen folgende Punkte: Bei Chlorella fusca sind Induktionsphänomene bekannt, z.B. die Ausbildung der Isocitratlyase (57), die in weniger als 1 Stunde ablaufen. Chlorella vulgaris benötigte für die Induktion des Hexose-Aufnahmesystems sogar nur 15 Minuten (75), wahrscheinlich der minimalste Zeitraum, in dem dieser Eucaryont die induzierten Proteine des Transportsystems synthetisieren kann. Beobachtet man das zeitliche Verhältnis zwischen Induktion eines Proteins und der Generationszeit eines Organismus, dann fügt sich ein Zeitraum von 15 Minuten bei 8 Stunden zellulären Überlebens gut in das bisher bekannte Schema. So benötigten beispielsweise Bakterien bei einer Verdopplungszeit von 20 Minuten 2.5 Minuten für die de-novo Synthese eines funktionsfähigen Bakterienproteins. Andererseits liegen diese Zeiträume deutlich unter den 2-2.5 Stunden, die für das erste Auftreten von Sulfonsäureaufnahme/erhöhter Sulfataufnahme in Chlorella fusca gemessen wurde. Auch bei Monochrysis lutheri stieg die Sulfataufnahmekapazität unter S-Mangelbedingungen erst nach einer lag-Phase von zwei Stunden an (52). Beide Zeitangaben deuten darauf hin, daß die lag-Phase mit mehr Aktivität gefüllt sein muß als der eigentlichen Synthese eines Proteinfaktors/Transportsystems, sei es auch noch so aufwendig codiert oder zu processieren. Der Zeitraum von 2.5 Std. wird vielmehr benötigt, um den Effektor Sulfatpool auf eine kritische Grenze abzusenken und damit die nachfolgende Derepression auszulösen.

Aufgrund dieser Daten ist es möglich, den Sulfatpool in normalen sulfatgewachsenen Zellen von Chlorella fusca abzuschätzen: Er liegt bei 10^{-6} nmol/Zelle (etwa 1 mM) und damit in der gleichen Größenordnung wie bei Pilzen (210).

Ein vergleichbares Regulationssystem ist auch bei Chlamydomonas reinhardtii bekannt (102): Bei N-Mangel entwickeln sich neben erhöhter Nitrataufnahme auch spezifische Aufnahmesysteme für Harnstoff und Arginin, die bei ausreichender anorganischer N-Versorgung reprimiert vorlagen. Williams und Hodgson (209) zeigten, daß Harnstofftransport erst nach einer lag-Phase von einer Stunde ab Beginn des N-Mangels eintrat und ein Maximum nach 2 Stunden erreichte. Zugabe von anorganischem Stickstoff zu diesem Zeitpunkt bewirkte eine sofortige Abnahme des Harnstofftransportes auf 50 % der Ausgangsgeschwindigkeit (20 Minuten) und auf 1 % innerhalb von 60 Minuten.

Nicht ganz so schnell nahmen bei Chlorella fusca Sulfonsäureaufnahme und erhöhte Sulfataufnahme nach Sulfatzugabe ins Medium ab (Abb.6): Nach einer Stunde betrug die Sulfonataufnahme 45 %, die Sulfataufnahme noch 33 % der Ausgangsaktivität und erst 9 Stunden später war das Aufnahmeniveau reiner Sulfatkulturen erreicht.

Die **Abnahme der Transportkapazitäten** für ÄSS/Taurin bzw. für Sulfat wurden durch Cycloheximid nicht beeinflusst - ein Anzeichen dafür, daß das wirksam werdende abbauende Prinzip durch Sulfatzugabe nicht erst spezifisch induziert werden muß. Verminderte Transportraten werden demzufolge nicht durch de-novo Synthesen spezifischer Proteasen verursacht sondern durch simple "Ausdünnung" (turnover) beider Transportsysteme infolge bereits vorhandener Proteasen. Unbekannt ist in diesem Zusammenhang allerdings, ob das jeweilige System nach Sulfatzugabe völlig abgebaut wird oder ob es z.B. durch Verlust einer essentiellen prostethischen Gruppe nur deaktiviert wird.

Diese Erklärung des Transportrückgangs gewinnt zusätzlich Plausibilität vergleicht man das Verhalten eines anderen Enzymsystems nach Sulfatzugabe: Auch die Aktivität der Arylsulfatase geht in Gegenwart von Sulfat auf Null zurück, allerdings (141) wesentlich langsamer als die ÄSS-Aufnahme. Die Halbwertszeit beträgt 8 Stunden und Cycloheximid hemmt sehr stark die Abnahme des Enzyms. Offensichtlich ist also hier (aufgrund des langsameren turn-overs des Enzymsystems) die Induktion einer spezifischen "Destruase" erforderlich, während bei der ÄSS-Permease diese Maßnahme infolge des rascheren turn-overs nicht nötig erscheint.

Die auffallend schnelle Antwort Chlorella fuscas auf Sulfatzugabe (Abb.20) ist eine Folge der raschen Sulfataufnahme in ÄSS/Taurin-Algen ("Sulfatmangelalgen"). Sie zeigt, wie schnell diese Alge ihren intracellulären Sulfatpool nach einem Mangelzustand wieder auffüllen kann und somit eine rasche Reaktion auf Sulfatzugabe gewährleistet: Das aufgenommene Sulfat kann bereits innerhalb der ersten 5 Minuten nach Zugabe die gesamte Zelle "überfluten" und einen sofortigen Stop aller (Aufnahme-)Prozeße veranlassen, die vom früheren, abgesenkten Sulfatpool bewirkt wurden.

Zusammenfassend: Die Alge Chlorella fusca kann ÄSS/Taurin über ein eigenständiges Sulfonsäure-Aufnahmesystem in die Zelle aufnehmen und sie danach als vollwertige S-Quelle nutzen. Diese Fähigkeit ist jedoch in sulfatgewachsenen Algen nicht vorhanden sondern entwickelt sich ca. 2.5 Stunden nach Umsetzung auf sulfatfreies Medium ("lag-Phase") und bildet sich sofort nach Sulfatzugabe zurück.

Dies wurde interpretiert als Folge einer **Poolgrößenregulation**, genauer als Folge des intracellulären Sulfatpools. Die Sulfonsäureaufnahme zeigte sich demnach bei guter Sulfatversorgung (aufgrund des hohen Sulfatpools) reprimiert und wurde erst unter entsprechenden Mangelbedingungen dereprimiert.

Nachdem bis jetzt allerdings noch keine weiterführenden Untersuchungen über diese Regulationsform auf genetischer Ebene vorliegen, sollte der Begriff **Derepression** sehr weit gefaßt ("definiert") werden: Unter **Derepression** wird der Anstieg einer Enzym/Systemaktivität als Antwort auf niedrige Poolkonzentrationen, bzw. das Fehlen eines bestimmten Stoffes verstanden (Induktion: Anstieg einer Enzym/Systemaktivität als Antwort auf die Anwesenheit einer extern angebotenen Substanz).

Nach dieser Vorstellung agiert Sulfat, bzw. ein davon abgeleiteter nicht-reduzierter Metabolit des Sulfats (Sulfatester, Sulfolipid) als metabolischer Repressor, der die Expression vorhandener genetischer Information ("Aufnahme von Sulfonsäuren") in der Alge verhindert. Im klassischen Sinn wirkt Sulfat als niedermolekularer Effektor, der die Strukturgene reprimiert, die für ein oder mehrere Proteine des Sulfonsäure-Aufnahmesystems codieren.

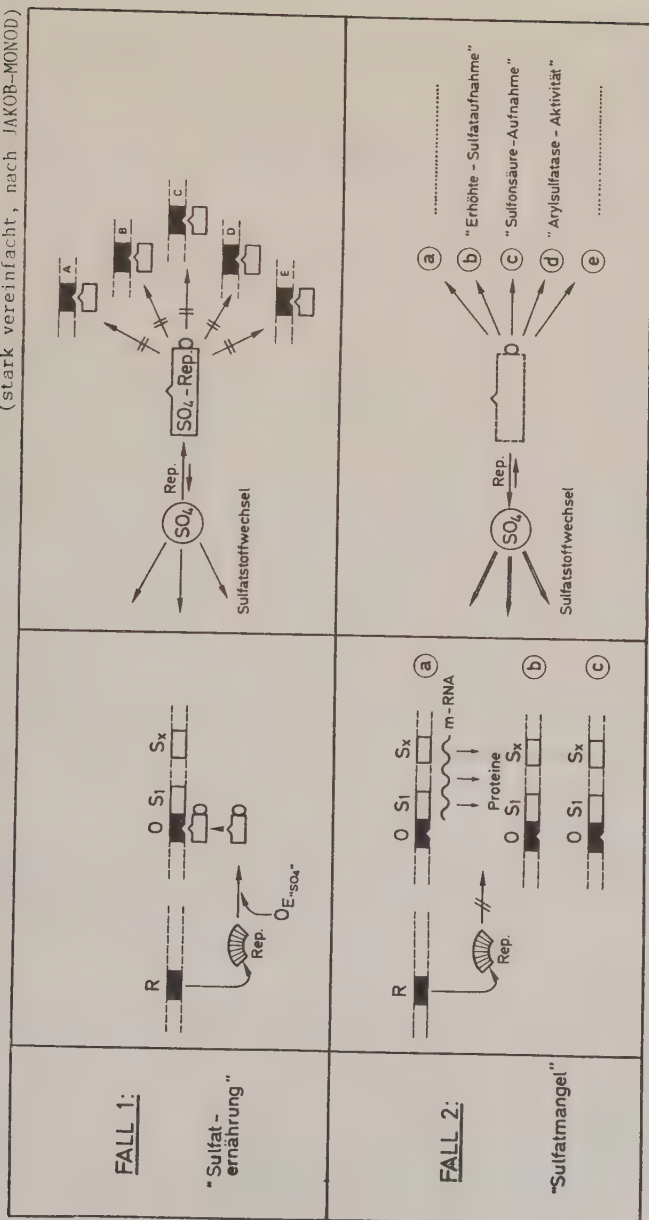
Für diesen Fall, der in der Natur bei adäquater Sulfatversorgung den Normalfall darstellt, wird der Begriff "**Substratrepression**" vorgeschlagen (als Sonderfall einer Katabolitrepression, siehe Abb.56).

Sulfatrepression spielt in Chlorella fusca aber auch eine Rolle bei der Regulation der Sulfataufnahme selbst. Diese kann in Abwesenheit von Sulfat bis auf das 10-fache gesteigert werden ("**Derepression unter Mangel**"), während Sulfatzugabe zu diesem Regulationsstatus eine sofortige Rückbildung der Aufnahme auf das Ausgangsniveau bewirkte ("**Substratrepression**"). Dieses Regulationsprinzip ist auch nicht allein auf Chlorella fusca beschränkt sondern von zahlreichen anderen Organismen bekannt: Gesteigerte Sulfataufnahmeraten bei S-Mangelbedingungen wurden u.a. von Bakterien (56), Cyanobakterien (95, 133, 200), Algen (52, 134, 201, 202), Pilzen (19, 210) und höheren Pflanzen (35, 65, 120, 182, 183) beschrieben.

Das Prinzip der "**Derepression unter Mangelbedingungen**" scheint auch bei anderen Mangelzuständen gültig zu sein, da z.B. Phosphatmangel zur Erhöhung der Phosphataufnahme bei Algen und Pilzen führte (15, 125). Bei Euglena konnte zusätzlich zur gestiegenen Phosphataufnahme auch die Synthese einer neuen sauren Phosphatase im Pellikel aufgezeigt werden (15).

Ähnliche Regulationssysteme wurden auch für die Nitrataufnahme nach vorausgegangenem Stickstoffmangel (36, 197, 199), ebenso für Mangelzustände im C-Stoffwechsel gefunden. So führte beispielsweise ein abgesenkter CO_2 -Partialdruck in Algen und Cyanobakterien zur Ausbildung eines high-affinity CO_2 -Aufnahmesystems (184, 192). Marine Diatomeen entwickelten im Dunkeln bei fehlender Photosynthese Aufnahmesysteme für organische Säuren und Zucker, die unter Lichtbedingungen reprimiert waren (auch in Abwesenheit dieser Substrate im Medium!). Der Autor bezeichnete dieses Regulationsprinzip als ökologisch vorteilhafter, da die Anwesenheit organischer Verbindungen im Meerwasser

(stark vereinfacht, nach JAKOB-MONOD)



Fall 1: Im Zuge der Substratrepression wird der von einem Regulator gebildete (inaktive) Repressor durch Anlagerung des Effektors (z.B. Sulfat) aktiviert. Nach Veränderung der räumlichen Konfiguration blockiert dieser Rep.-Sulfat-Komplex das Operatorgen ein oder mehrerer Genorte (multiple Wirkung des Sulfats).

(R = Regulatorgen; Rep. = Repressor; O = Operatorgen; S₁-S_x = Strukturgen; E = Effektor)

Fall 2: Bei Eintritt längeranhaltender Sulfatmangelbedingungen wird der intracelluläre Sulfatpool unter einen bestimmten Schwellenwert abgesenkt und kann als Effektor den Repressor nicht mehr in ausreichendem Maße aktivieren. Das Operatorgen wird nicht mehr blockiert, alle Strukturgene des Operons bilden über m-RNA Proteine.

äußerst gering sei und für eine Substratinduktion nicht ausreichen dürfte (84). Bei Neurospora crassa wurde unter C/Energie-Mangel ein Hexoseaufnahmesystem ausgebildet, das bei optimaler Nährstoffversorgung (Glucose) katabolisch reprimiert vorlag (173). Zwei weitere Beispiele für die **Poolgrößenregulation** in Organismen lieferten die Uracil-Aufnahme in Chlorella fusca (104) und die Tryptophanaufnahme in den Pilz Neurospora crassa (206).

Sulfat/Schwefel-Mangelbedingungen führten in Chlorella fusca aber nicht nur zur Derepression sulfonsäure-bzw.sulfattransportierender Aufnahmesysteme sondern auch zur Derepression anderer Enzyme des S-Stoffwechsels, z.B. von Sulfatasen oder der Thiosulfatreduktase (Tab.25/29). So folgte die Ausbildung der Arylsulfatase nach Niedermeyer den gleichen Regulationsprinzipien wie die Entwicklung der ASS/Taurin-Permease in 4.1/4.2 (141) und zeigte identische Zeitkinetiken der Ausbildung nach Umsetzung auf Sulfatmangelmedium (z.B. erstes Auftreten der Arylsulfataseaktivität nach ca. 2.5 Stunden).

Auch die Fähigkeit zur Metabolisierung der aufgenommenen Sulfonsäuren wurde erst aufgrund des Sulfatmangelsignals in der Alge ausgebildet und unterlag demnach den gleichen regulativen Prinzipien wie das Aufnahmesystem selbst. Die Unterscheidung dieser beiden Vorgänge gelang mit Hilfe eines methodischen Tricks: So vermochten auf N-Mangelmedien gewachsene Kulturen zwar die Sulfonsäure Taurin über ein neu ausgebildetes Aminosäure-Aufnahmesystem aufzunehmen, konnten sie aber anschließend im Gegensatz zu S-Mangelverhältnissen nicht weiter abbauen und als N/S-Quelle nutzen. Die Derepression der Enzymsysteme zur Sulfonataufnahme, Spaltung der C-S Bindung und Metabolisierung der entstehenden Spaltprodukte sollte deshalb als zeitlich parallel angesehen werden.

Die koordinierte Regulation von Aufnahmeprozessen und anderen Enzymsystemen durch Mangelbedingungen besitzt Vorteile ökologischer, ökonomischer und evolutiver Art, da sie Organismen befähigt, sich an die jeweils herrschenden Nährstoffverhältnisse optimal anzupassen:

- 1- Bei ausreichendem Nährstoffangebot arbeiten die jeweiligen Aufnahmesysteme mit relativ geringem Aufwand und entlasten somit den Energie- und Baustoffwechsel des Organismus
- 2- Bei Nährstoffmangel werden diese Aufnahmesysteme in zunehmendem Maße dereprimiert und erlauben demzufolge eher eine Deckung des aktuellen Bedarfs.
- 3- Gleichzeitig werden neuartige Aufnahme/Enzymsysteme aktiviert, um auch alternative Verbindungen für das Wachstum nutzen zu können.

Insgesamt gesehen, scheint das Prinzip "**Derepression unter Mangelbedingungen**" eine generelle Strategie für die Kontrolle von Aufnahmemechanismen zu sein, die selbst im Tierreich Anwendung findet (z.B. Erhöhung der Aufnahmegeschwindigkeit für Hexosen in Hühnerfibroblasten nach vorherigen Mangelbedingungen (130)). Auch im marinen Environment behält dieses Prinzip Gültigkeit: So findet man hier die gleichen Regulationsprinzipien wie in Süßwasserorganismen, obwohl sich die prozentuale Zusammensetzung des Meerwassers in den letzten geologischen Perioden nicht wesentlich geändert hat (z.B. Sulfat kommt in 27 mM Konzentration und damit mehr als ausreichend für das Wachstum vor) (44).

Koordinierte Regulation unter Mangelbedingungen stellt eine wichtige Erweiterung des Prinzips "Derepression unter Mangel" dar, da sie den Organismen erlaubt, auf Mangelsituationen mit einer homogenen Mangelstrategie und situationsspezifischen Reaktionen zu antworten – und damit zu überleben.

Denkmöglichkeiten zum Mechanismus eines solchen Regulationstypus wurden bereits anhand der in *ÄSS*-Algen auftretenden Aufnahmesysteme für Sulfonsäuren und Sulfat diskutiert. Sie setzten eine multiple Wirkung des absinkenden Sulfatpools voraus.

Multiple Wirkungen einer bestimmten Substanz (z.B. eines Phytohormons) sind bereits zur Genüge bekannt und auf genetischem Niveau über die gleichartige Beeinflussung verschiedener Transkriptionseinheiten erklärbar. Eine Vereinfachung dieses regulatorischen Eingriffes wäre darüber hinaus entscheidend möglich durch Annahme eines gemeinsamen Aktivierungsmodus für alle daran beteiligten Enzymsysteme.

Wie bereits angesprochen, könnte sich diese Vorstellung z.B. anhand gleichgebauter Blockadesequenzen manifestieren, die nach Auslösung des entsprechenden "Signals" an ähnlichen Schnittstellen durch eine gemeinsame "Modifikase" abgespalten werden und damit zur Aktivierung der Enzymsysteme führen (siehe auch ADP-Ribosylierung von Proteinen als multifunktionaler Prozeß, der Schlüsselenzyme mehrerer Stoffwechselwege gleichzeitig zu modulieren vermag (66, 88)).

In diesem Sinne kann auch der abgesenkte Sulfatpool in *Chlorella fusca* als multifunktionaler Auslöser vieler S-beschaffener Prozesse wirken und aufgrund seiner multiplen Effekte die Algenzelle zur Ausbildung eines "**Sulfatmangel-Syndroms**" zu veranlassen (Tab.33). Einschränkung muß jedoch erwähnt werden, daß die Aufzählung dieser Symptome keinen Anspruch auf Vollständigkeit erheben kann. Sie beruht mit auf der "Zufälligkeit" bekannter Meßtechniken, die in unserem Institut routinemäßig angewandt werden. Unabhängig davon, ist dieses Sulfatmangel-Syndrom als Ausdruck einer homogenen Sulfat/Schwefel-Mangelstrategie der Alge anzusehen, entwickelt im Laufe des Evolutionsprozesses, um ein Überleben auf erniedrigtem Schwefelgehalt sichern zu können.

Tab.33: "Sulfatmangel-Syndrom" in Chlorella fusca

- Erhöhte Sulfataufnahme
- Ausbildung von Sulfonsäureaufnahme/Metabolisierung und von Arylsulfataseaktivität
- Gesteigerte Aktivität der Enzyme des S-Stoffwechsels
- Erniedrigte Aktivität der Enzyme des N-Stoffwechsels
- Veränderte Fettsäure-Zusammensetzung in den Lipoiden (verstärktes Auftreten ungesättigter Fettsäuren)

Aber:

- Keine auffälligen (ultra-)strukturellen Veränderungen
- Keine Veränderungen äußerer Wachstumsparameter (Chlorophyllgehalt, Zellzahl, OD_{680})

Es zeigt exemplarisch, daß die Enzymaktivitäten Chlorella fuscas unter guter Nährstoffversorgung auf einem relativ geringem Niveau einreguliert sind und erst unter Mangelbedingungen stimuliert/sukzessive ausgebildet werden.

Tab.33 zeigt ferner, daß bei einsetzendem Schwefelmangel zunächst alle Mechanismen regulatorisch auf die natürliche Schwefelquelle Sulfat bezogen sind und damit von der oxidativen Seite des S-Stoffwechsels gesteuert werden.

Es gibt jedoch gute Gründe anzunehmen, daß die hier beschriebenen Reaktionen auf Sulfatmangel nur Teilaspekte einer umfassenderen "Schwefel-Mangelstrategie" der Alge darstellen, die auch Regulationsmechanismen auf der reduktiven Seite des S-Stoffwechsels beinhaltet.

So konnte gezeigt werden, daß die Alge in Abhängigkeit von den herrschenden (S-) Ernährungsbedingungen (mindestens) drei verschiedene Erscheinungsformen aufweist, die reversibel ineinander übergehen können.

- 1- Der Sulfatstatus - bei ausreichender Sulfatversorgung
- 2- Der Sulfatmangelstatus - bei fehlender Sulfatversorgung, aber zum Wachstum ausreichender Schwefelernährung (z.B.Cys, Met, Sulfonsäuren, Sulfatester)
- 3- Der Schwefelmangelstatus - bei fehlender Schwefelernährung

Die Unterscheidung dieser Formen 1-3) wurde durch das Zusammentreffen methodisch günstiger Umstände ermöglicht, z.B. durch den Einsatz alternativer Schwefelquellen zur Ernährung der Alge (Sulfonsäuren) und durch die physiologischen Eigenschaften der Alge selbst (limitierte Oxidationskapazitäten für reduzierte S-Verbindungen). Während nämlich die beiden Extremformen, Sulfat- bzw. Schwefelmangelform sehr leicht auszubilden waren (gut zu unterscheiden), konnte der **Sulfatmangelstatus** erstmalig durch das Wachstum auf Verbindungen wie Athansulfonsäure/Taurin aufgefunden werden. Gut verwertbare Sulfonsäuren erweisen sich damit als geeignetes Hilfsmittel zu Erzeugung interner Sulfatmangelbedingungen, da sie trotz verändertem zellulärem Status ("Sulfatmangel-Syndrom") die Schwefelernährung der Alge sichern konnten.

Die Ausbildung des **Schwefelmangel-Zustandes** erfolgte dagegen nur in Abwesenheit aller verwertbaren Schwefelquellen im Medium. Die Versuche in 8.2 zeigten ferner auf, wie scharf der Übergang Sulfatmangelform/Schwefelmangelform bei allmählich eintretenden S-Mangelbedingungen anzusehen ist. Analog zur Ausbildung der Sulfatmangelzelle (mangelnde Größe des intracellulären Sulfatpools) könnte daher das Auftreten des Schwefelmangelstatus in Chlorella fusca durch das Unterschreiten einer kritischen Grenze des S-Stoffwechsels interpretiert werden, die eine vollständige Umsteuerung der Algenzelle zur Folge hat.

Tab.34: "Schwefelmangel-Syndrom" in Chlorella fusca

- Starke Wachstumshemmung
(Zellzahl, Zellgröße, Frischgewicht/Zelle)
- (Ultra-)strukturelle Veränderungen der Algenzelle
- Mangelnde Chlorophyllausbildung ("Chlorose")
- Mangelnde Proteinausbildung
- Akkumulation löslicher N-Verbindungen in der Zelle
(z.B. von Arginin)
- Erhöhter Fettgehalt der Zellen
- Veränderte Fettsäure-Zusammensetzung in den Lipoiden
- Veränderte Enzymaktivitäten des S- und N-Stoffwechsels
 - ..- Enzyme des N-Stoffwechsels zeigen generell eine Abnahme der Enzymaktivitäten
 - ..- Enzyme des S-Stoffwechsels verhalten sich dagegen nicht einheitlich (Tab.35)

Das "Schwefelmangel-Syndrom", wie *Chlorella fusca* es zeigt, hat folgende Symptome (Tab.34). S-Mangelbedingungen bewirkten im einzelnen:

Eine Herabsetzung des Wachstums (Zellzahl, Zellgröße, Frischgewicht der Zelle sind erniedrigt). Ferner zeigten sich auffallende strukturelle Veränderungen der S-Mangelzelle, die im Habitus stark an die Überdauerungsformen anderer Algenarten erinnerten (123): Reduktion des Photosyntheseapparates (Chlorose), Auftreten von Speicherverbindungen und Verdickung der Zellwand.

Im Gegensatz dazu erhöhte sich der Arginingehalt einer S-Mangelzelle auf 25.1 % des freien Aminosäure-Stickstoffs, ebenso stieg der Gehalt freier Ammoniumionen. Die Akkumulation löslicher N-Verbindungen unter S-Mangelbedingungen wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben (11,103), z.B. von NH_4^+ , Arg, His oder auch von Nitrat, Glutamin, Asparagin (N-Speicherformen der Zelle).

Auch die Erhöhung des Gesamtlipoidgehaltes in S-Mangelzellen wurde bereits in der Literatur beschrieben (11), allerdings weniger häufig wie bei N/P-Mangelzuständen (10,47). Gedeutet wurde diese Erscheinung allgemein als Folge einer verminderten Eiweißbiosynthese, da Proteine nur bei ausreichendem C/N/P/S-Gehalt einer Zelle synthetisiert werden können. Bei herrschenden Mangelbedingungen scheinen dagegen die gemeinsamen Ausgangsprodukte bevorzugt für Fett-/Stärkebildung verwendet zu werden. Gleichzeitig wird mit dieser Maßnahme der Energiegehalt der Algenzelle erhöht und eine Energiekonservierung für spätere Zeiten ermöglicht.

Parallel zur Erhöhung des Lipoidgehaltes in den Zellen veränderte sich auch die Zusammensetzung der Fettsäuren in den Lipoiden (Tab.30) : In den S-Mangelzellen überwogen nun ungesättigte Fettsäuren, v.a. der Gehalt an "Ölsäure" stieg auf über 50 % des Gesamtgehaltes an Fettsäuren an. Diese einseitige Erhöhung könnte gut mit der eben geäußerten Überlegung ("Energiespeicherung") erklärt werden, da die Ausbildung von Doppelbindungen generell zur Vergrößerung des Energiegehaltes einer Substanz führt. Zudem zeigten Zellen mit erhöhtem Gehalt an ungesättigten Fettsäuren in den Außenmembranen (erhöhte Fluidität) auch ein verändertes Aufnahmeverhalten und erleichterten das Eindringen von Substanzen in die Zelle (23, 166).

Schließlich ergaben sich bei S-Mangelbedingungen auch veränderte Enzymaktivitäten des S- und N-Stoffwechsels. Enzyme des N-Stoffwechsels zeigten dabei generell eine Abnahme der Enzymaktivität (Glutaminsynthetase, Nitratreduktase); die Enzyme des S-Stoffwechsels verhielten sich dagegen eher widersprüchlich: Während einige der Enzymaktivitäten anstiegen (z.B. Sulfonsäurepermease, Sulfatpermease, Thiosulfatreduktase, Cysteinsynthase, D- oder L-Cysteindesulphydrase), zeigten andere Enzyme stark erniedrigte Aktivitäten ("Sulfataktivierung") oder fehlten (Arylsulfatase). (Dagegen Sulfatmangelzellen: stark erhöhte Enzymaktivitäten des S-Stoffwechsels).

Zusammenfassend läßt sich damit folgendes Modell zur Hierarchie S-aufnehmender, bzw. S-verarbeitender Enzyme bei Limitierung der Schwefelversorgung im Medium aufstellen:

- A) Bei allmählich eintretenden S-Mangelbedingungen werden zunächst die Enzyme des S-Stoffwechsels über die Absenkung des Sulfatpools generell aktiviert und damit der Umsatz des in der Zelle noch vorhandenen Schwefels erhöht.
Gleichzeitig findet eine Stimulierung der Transportkapazitäten bereits vorhandener Aufnahmesysteme (z.B. für Sulfat, Methionin), sowie die Ausbildung neuer Transportsysteme für alternative Schwefelquellen (z.B. Sulfonsäuren) statt.
- B) Verschärft sich trotz dieser Maßnahmen der physiologische S-Mangel weiterhin, wird aufgrund des Mangels an reduzierten und oxidierten Produkten des S-Stoffwechsels die Bildung einer Überdauerungsform eingeleitet.
In dieser als "Schwefelmangelform" bezeichneten Zelle ist der Stoffwechsel zwar grundsätzlich reduziert, dennoch weisen viele der zuvor dereprimierten Aufnahmesysteme (z.B. für Sulfat, Methionin, Sulfonsäuren) bzw. anderweitig exponierte Enzyme des S-Stoffwechsels (Thiosulfatreduktase) eine stark erhöhte spezifische Aktivität auf.
Dadurch wird gewährleistet, daß die Zelle nach Beendigung des vorübergehenden S-Mangelzustandes möglichst schnell in den Genuß verwertbarer S-Verbindungen gelangt und diese in den Stoffwechsel einschleusen kann.

Die Überwindung des Schwefelmangel-Status in Chlorella wird damit v.a. durch die Aufrechterhaltung bestimmter Schlüsselenzyme des S-Stoffwechsels beschleunigt, zu denen in diesem Zusammenhang ganz sicher die Sulfonsäurepermease zu rechnen ist. Die Ausbildung der Sulfonataufnahme gehört demzufolge zu den primären Mechanismen einer Strategie, mit denen die Alge auf Limitierung der S-Versorgung reagieren kann. Noch wichtiger scheint allerdings die Rolle der Sulfatpermease selbst zu sein, die zu Beginn der Schwefelminderversorgung ein vorläufiges Maximum erreichte und dann parallel zur Ausbildung der Dauerstadien auf ein geringeres, aber immer noch stark erhöhtes Niveau zurückging (Abb.46).

Weitere Symptome des S-Mangelstatus können zwangslos durch die Minderversorgung an Schwefel und die daraus resultierende Störung des für den normalen Stoffwechsel notwendigen Verhältnis an C/N/P/S erklärt werden.

Beispiel 1: Schwefelmangel führt in der Zelle zu einem Stau an verwertbaren löslichen N-Verbindungen (z.B. NH_4^+ , Aminosäuren oder Nitrat) und damit zu einem Rückgang der Enzymaktivitäten gewisser N-metabolisierender Enzyme, z.B. Glutaminsynthetase oder Nitratreduktase (45, 63, 153) (siehe Tab.35).

Gleichzeitig kommt es zu einer Akkumulation basischer Aminosäuren, v.a. Arginin, die als N-Speicherformen der Zelle reagieren und zur Veränderung der relativen Zusammensetzung löslicher Aminosäuren in Chlorella fusca führen können (Abb.50) (siehe auch 11, 103).

Beispiel 2: Schwefelmangel führt zur erhöhten Fettbildung in den Algenzellen, vermutlich aufgrund des gleichen Wirkungsmechanismus, der auch bei anderen Algen, Pilzen und Hefen zur Fettproduktion unter Mangelbedingungen führte (10, 11, 174). Anlaß für diese Fettbildung wäre demzufolge eine verminderte Eiweißsynthese, da die Zelle das in den Proteinen artspezifisch vorgegebene Verhältnis an C/N/S auch unter S-Mangelbedingungen nicht verändern kann (siehe Tab.35).

Nur im Falle von Speicherproteinen vermag die Zelle gezielt mit der Bildung von cystein/methioninarmen Speicherformen zu reagieren, z.B. Hordeum vulgare (17). Allgemein gilt, daß das S/N-Verhältnis in Proteinen S-gestreßter Samen deutlich geringer ist als in den gut mit Schwefel versorgten Kontrollpflanzen (90).

Wie anhand dieser Beispiele ferner gezeigt werden kann, setzt Schwefelentzug die synthetischen Fähigkeiten einer Zelle nicht generell herab - sondern erlaubt vielmehr die gezielte Produktion diesem Zustand angepaßter Verbindungen.

Allerdings sollte in diesem Zusammenhang deutlich auf das Phänomen **spezifischer und unspezifischer Reaktionen bei Mangelzuständen** hingewiesen werden.

Die Unterschiedlichkeit dieser Reaktionstypen zeigte sich besonders gut, nachdem man das Verhalten der Alge bei einem zweiten Mangelzustand genauer untersucht hatte. Dies geschah am Beispiel N-frei (bzw. N/30) kultivierter Algen, da Chlorella fusca in gut durchlüfteten Massenkulturen nur auf Unterversorgung an Stickstoff (Eisen) schnell genug reagierte, nicht jedoch auf das Fehlen von P, Ca, Mg, K oder Na.

Die Ergebnisse dieser vergleichenden Untersuchungen bei N-Mangel sind in Tab.35 zusammengestellt: Spezifische Reaktionen auf N-Mangelbedingungen konnten anhand weniger Beispiele aufgezeigt werden, z.B. die erhöhte Aktivität von Nitratreduktase oder der Glutaminsynthetase, bzw. die Ausbildung eines Aminosäure-Aufnahmesystems (gemessen über die Taurinaufnahme). Dies waren situationsspezifische Verhaltensweisen, wie sie auch für andere Organismen bei N-Mangelzuständen beschrieben wurden (92, 144, 148, 195, 196).

Tab.35: Vergleich ausgewählter Wachstumsparameter und Enzymaktivitäten in *Chlorella fusca* bei Anzucht unter verschiedenen Bedingungen der S/N-Versorgung

Ernährungsbedingungen	Chlorophyllgehalt	Zellzahl	Frischgewicht pro Zelle (g)	Proteingehalt (löslich)	Stärkegehalt (Z TC)	Lipidgehalt (Z TC)
Kontrolle	6.25 mg	25.3×10^8	8.6×10^{-10}	63.5 mg	3.65	18.5
ÄSS	6.8 "	30.4×10^8	7.95×10^{-10}	58.7 "	3.9	21.5
S-Mangel	0.04 "	1.6×10^8	4.1×10^{-10}	1.2 "	7.8	36.5
N-Mangel	0.03 "	0.3×10^8	3.2×10^{-10}	0.3 "	11.9	60.0
	Sulfat-aufnahme	ÄSS-aufnahme	Taurin-aufnahme	Methionin-aufnahme	Glutamin-synthetase	Nitrat-reduktase
Kontrolle	610	0	0	265	23.6	0.6
ÄSS	2796	380	396	714	14.0	-,-
S-Mangel	4146	1224	980	892	0	0.1
N-Mangel	55	0	46	-,-	130.4	4.2
	Thiosulfat-reduktase	Cystein-synthase	Sulfat-aktivierung	Aryl-sulfatase	D-Cystein-desulphydrase	L-Cystein-desulphydrase
Kontrolle	0.18	7.6	0.08	0	91.4×10^{-3}	18.3×10^{-3}
ÄSS	0.41	18.4	0.13	10.6	132.0×10^{-3}	60.0×10^{-3}
S-Mangel	0.62	8.4	0.035	0	145.0×10^{-3}	168.2×10^{-3}
N-Mangel	0.77	18.1	0.76	-,-	437.2×10^{-3}	243.6×10^{-3}

Die Aufnahmeangaben wurden angegeben in $\mu\text{mol} \times \text{Zelle}^{-1} \times \text{h}^{-1} \times 10^{-6}$, Enzymdaten in $\frac{\mu\text{mol}}{\text{mg Prot} \times \text{h}}$. Versuchsbedingungen siehe Tab.3,6,7; Abb.9; 2.4.10 - 2.4.11 und 2.6.3 - 2.6.9.

Bezogen auf das Verhalten von Aufnahmesystemen/Enzymaktivitäten antwortete die Alge damit auf S- und N-Mangel in analoger Weise. Unterschiede zeigten sich jedoch in der Priorität dieser Mechanismen: Während bei S-Mangel Chlorella fusca v.a. mit der erhöhten Aufnahme von Sulfat und anderer S-haltiger Verbindungen reagierte, schien die Alge bei N-Mangelbedingungen zunächst interne N-Speicher zu mobilisieren und den Umsatz des in der Zelle vorhandenen Stickstoffs zu erhöhen. Die Ausbildung eines Aminosäure-Aufnahmesystems (Transport alternativer N-Quellen) erfolgte erst sekundär, bei verschärften Mangelbedingungen (8.3).

Neben diesen spezifischen Reaktionen auf N-Mangel im Kulturmedium zeigte die Alge auch zahlreiche "unspezifische Reaktionen", d.h. gleiche Verhaltensweisen wie bei anderen Mangelzuständen. Im Gegensatz zu S-Mangelbedingungen schien die Alge dabei wesentlich schneller und stärker zu reagieren (Abb.45-47/48-49, Tab.35), was sich wohl aufgrund des quantitativen Verhältnisses an C/N/S-Atomen in Chlorella fusca (200:20:1) erklären lassen sollte (159).

Als unspezifische Reaktionen auf N-Mangel erhöhte sich z.B. der Fettgehalt bis auf 60 % des Trockengewichtes (siehe auch 47), der Anteil an ungesättigten Fettsäuren in den Lipoiden stieg auf über 75 %. Die C₁₈₋₁ Fettsäure "Ölsäure" überwog mit 61.1 % alle übrigen vorkommenden Fettsäuren und erstmals konnten auch ungesättigte C₁₆-Fettsäuren nachgewiesen werden (Tab.30).

Besonders auffallend war weiterhin der hohe Gehalt an Sekundärcarotinoiden des Astaxanthintyps (47), der bei S-Mangelzellen noch deutlich geringer ausgeprägt war. Die Konzentration dieses orangerot gefärbten Produktes, das v.a. an ungesättigte Fettsäuren adsorbiert vorlag, war so hoch, daß ein bei 10 000 g abzentrifugierter Rohextrakt trübe erschien und erst durch Ultrazentrifugation geklärt werden konnte.

Die strukturellen Veränderungen der Algenzelle war bei beiden Mangelzuständen gleichermaßen ausgeprägt, ebenso die aus Abb.45/48 ersichtliche Strategie der Alge diese Erscheinungsform bereits bei nicht allzu scharfem Mangel auszubilden.

Wie mehrfach erwähnt, erinnert diese Zellform in Habitus/Funktion an Dauerstadien, an Formen zum Überdauern ungünstiger Perioden, wie sie im Falle der Chlorophyceen v.a. den Cystozygoten zugeschrieben wurden.

Die Alge Chlorella fusca weist allerdings keine sexuelle Fortpflanzung auf sondern vermehrt sich durch Zerklüftung des Plasmas und Bildung von 6-8 Autosporen. Daher sind Cystozygoten als mögliche Dauerformen nicht bekannt. Andererseits spricht der plötzliche Anstieg der Zellzahl parallel zum Auftreten dieser "Dauerstadien" gegen eine andere Form des Überdauerns (Encystierung unter Verdickung der Zellwand und Abbau des Photosyntheseapparates), wie sie z.B. von Cryptophyceen beschrieben wurde (123).

Tab. 36: Spezifische und unspezifische Reaktionen der Alge *Chlorella fusca*
auf S/N-Mangelbedingungen

	S-Mangelbedingungen	N-Mangelbedingungen
Spezifische Reaktionen	Erhöhte Sulfataufnahme Sulfonsäure-Aufnahme Erhöhte enzymatische Aktivität von - Thiosulfatreduktase - Cysteindesulhydrase Erniedrigte Enzymaktivität von - Glutaminsynthetase - Nitratreduktase Erhöhter Gehalt an Aminosäuren⁺ (v.a. von Arg, His) und von NH_4	Erhöhte Nitrataufnahme (197) Aminosäure-Aufnahme Erhöhte enzymatische Aktivität von - Glutaminsynthetase - Nitratreduktase Erniedrigte Enzymaktivität von - Sulfatpermease Erniedrigter Aminosäuregehalt (v.a. von Arg)
Unspezifische Reaktionen	Chlorose Verminderte Proteinbildung Veränderte (Ultra-)Struktur der Zellen Vermindertes Frischgewicht der Zellen Bildung von "Dauerstadien" Erhöhte Stärkespeicherung Erhöhte Fettspeicherung Erhöhter Gehalt an ungesättigten Fettsäuren Bildung von Sekundärcarotinoiden	

Es scheint vielmehr so, als ob diese Alge ähnlich wie Bakterien oder Pilze unter Mangelbedingungen (Sporulation/Konidienbildung) in eine außerplanmäßige Zellteilung eintritt -unter Bildung von Dauerformen (47,73,189). Die auftretenden Mangelzellen besitzen daher dieselbe Größe wie normal ausgebildete Autosporen, die erst im Laufe des Zellcyclus auf die Größe der Mutterzelle heranwachsen. Da andererseits für Zellteilungsphasen eine bestimmte Menge an S/N/P benötigt wird, muß Chlorella diese Tätigkeit relativ früh als Antwort auf exogene Mangelbedingungen einleiten und nicht erst bei bereits stark reduziertem Stoffwechsel als Endglied einer langen Kette von Notfallmechanismen.

Die in Tab.36 genannten **unspezifischen Reaktionen** der Alge auf Mangelbedingungen werden als Folge eines noch unbekannten "Auslösers" angesehen, der bei Störung des vorgegebenen C/N/S/P-Verhältnis zum Auftreten eines multifunktionellen Signals führt. Ähnlich wie für die Ausbildung spezifischer Reaktionen unter Sulfatmangel-Bedingungen ausführlich diskutiert (spez.Signal = abnehmender Sulfatpool), sollte hier ein universelles Signal die metabolische Antwort auf S/N-Mangel koordinieren. Unter Einbeziehung der reduktiven Seite des S-Stoffwechsels ergeben sich folgende Denkmöglichkeiten:

Punkt 1: Mit zunehmenden Mangelbedingungen kommt es zu einer Verknappung an (N-haltigen) reduzierten Schwefelverbindungen in der Zelle, v.a. an Aminosäuren (Cystein, Methionin und davon abgeleiteter Folgeprodukte).

Punkt 2: Als Ausgangspunkt weiterer regulativer Ansätze sollte v.a. Cystein gesehen werden, das eine exponierte Position an der primären Verknüpfungsstelle von S- und N-Stoffwechsel einnimmt und das bei N-Limitierung ebenfalls nicht mehr in ausreichendem Maße synthetisiert werden kann. Mit dieser Annahme ließe sich zwangslos die in Tab.35 aufgezeigte (und an sich paradoxe) stark erhöhte Aktivität bestimmter Enzyme des S-Stoffwechsels unter N-Mangelbedingungen erklären.

Punkt 3: Infolge des Cysteins mangels akkumulieren t-RNA-Formen, die weniger Thionukleotide als üblich enthalten. Sie unterliegen damit nicht nur in verändertem Ausmaß der Aminoacylierung sondern sind v.a. aufgrund ihrer modifizierten Form zur Regulation bestimmter Gene via Operon-Regionen nicht mehr in der Lage (78). Die Voraussetzung für einen multifunktionellen Auslöser wäre damit gewährleistet.

Punkt 4: Infolge des Cysteinmangels (und anderer Aminosäuren) kommt es zu einer Absenkung des t-RNA Pools in der Zelle und der Beladung entsprechender t-RNA Formen, sofern dieser Effekt nicht durch übermäßigen Proteinabbau aufgefangen wird (27). Cystein t-RNAs enthalten jedoch aufgrund ihrer Primärstruktur Cytokinine (82,131), (wie andere t-RNA Formen auch) die nun bei katabolischen Prozessen freigesetzt werden können und zu einer kurzfristigen Erhöhung des endogenen Cytokininegehaltes führen.

Die Menge der freigesetzten Verbindungen erscheint ausreichend, um zusammen mit den t-RNA unabhängig produzierten Cytokininmengen Zellteilung bzw. Prozesse der intracellulären Regulation beeinflussen zu können (204). Obwohl Vorkommen/Rolle der Phytohormone bei Algen großteils noch ungeklärt ist, wäre auch bei diesem Modell aufgrund der multiplen Wirkorte die geforderte Multifunktionalität des Signals gewährleistet.

Punkt 5: Häufig wurde in Mangelzellen auch ein erhöhter Gehalt an Guanosin 3'-diphosphat-5'-diphosphat (ppGpp) beschrieben - eine Verbindung, der ebenfalls eine multifunktionelle Signalfunktion nachgesagt wird (24). Wie mehrfach dokumentiert, akkumulieren v.a. Enterobakterien und Cyanobakterien diese Verbindung bei akutem Nährstoff-, Ionen- oder Energiemangel in den Zellen. So ließ sich in Cyanophyceen (64) die Abnahme freier Aminosäuren bei N-Mangelbedingungen mit einem kurzfristigen Anstieg der ppGpp-Konzentration korrelieren (Zeitliche Abfolge: ATP-GTP-ppGpp). Andererseits ist nach (22) auch nicht auszuschließen, daß ppGpp beim Abbau einer t-RNA vom 3'-Ende her gebildet werden kann (Zwischenform: pppGp und cyclisches Guanosin-Tetraphosphat). Die Autoren diskutierten in diesem Zusammenhang die wichtige Effektorrolle des ppGpp, das angelagert an ein neuentdecktes Aktivatorprotein (Ψ -Faktor), dessen weitere Aktivität behindert. Dies geschieht, indem es die nachfolgende Bindung des Ψ -Faktors an die RNA-Polymerase aufhob und somit die Ablesung genetischer Informationen für r-RNA, t-RNA und andere Produkte gemeinsam stoppte (Aber: ein Nachweis dieser Funktion bei Eucaryonten fehlt bisher).

Unabhängig davon, wie bei Mangelbedingungen die Auslöserung der **unspezifischen Verhaltensweisen** nun tatsächlich stattfindet, erfüllen sie eine wichtige Funktion: Sie sind neben zahlreichen spezifischen Reaktionen (gezielte/ökonomische Antwort) für die vielseitige, homogene Mangelstrategie der Alge mit verantwortlich und laufen unabhängig von der vorgegebenen Nährstofflimitierung in immer gleicher Art und Weise ab. Sie erlauben somit bei akutem Nährstoffmangel mit Hilfe genau festgelegter Maßnahmen das Überleben der Alge im aquatischen System zu sichern.

Einschränkend muß jedoch an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, daß die gewonnenen Ergebnisse auf sogenannten "Batch-Kulturen" basierten und daher unter kontinuierlichen Kulturbedingungen (Konstanz der Zellen aufgrund zu/abströmender Nährlösung) oder im natürlichen System (Konkurrenz der verschiedenen Organismen, Kombination unterschiedlicher Mangelsituationen (137), z.B. Nährstoff/Nährstoff, Licht/Nährstoff) verschiedene Modifikationen aufweisen können.

4.) Kritischer Ausblick

Welche Vorteile bringt nun aber die Aufnahme und Metabolisierung von Sulfonsäuren als Teil der S-Mangelstrategie ("spezifische Reaktion") für das Überleben der Alge im aquatischen System ?

So ist vorstellbar, daß Chlorella fusca auf diese Weise punktuell auftretenden Schwefelmangel im aquatischen System in einer Art "Sulfonsäurenische" überleben kann, z.B. bei Algenblüten, bei Massenkulturen obligater Sulfatverwerter oder nahe einer erdalkalireichen Mineralquelle.

Gerade die Sulfonatverwertung weist erhebliche Vorteile für das Überleben der Alge auf: Wie bereits erwähnt, gehört Chlorella fusca zu den mikrovakuolären Grünalgen, die weder in Vakuolen (Sulfat) noch im Cytoplasma Schwefel in nennenswerten Mengen gespeichert haben. Sie müßte daher auf jede Limitierung der Sulfat/S-Versorgung sukzessive mit Reduktion des Stoffwechsels, Einstellung des Wachstums und Bildung von Dauerstadien reagieren, wie sie es im Versuch innerhalb weniger Stunden tut. Aufgrund ihrer Fähigkeit, alternative Schwefelquellen (Sulfonsäuren) zusätzlich für das Wachstum nutzen zu können, vermag sie jedoch unter S-Mangelbedingungen weiterzuleben und sich zu vermehren. Damit ist dieser Teil der S-Mangelstrategie essentiell für das "persönliche" Überleben der Alge und schafft darüber hinaus **Wettbewerbsvorteile** gegenüber den Organismen, die diese Fähigkeit nicht besitzen.

Sulfonatverwertung kann aber nicht nur kurzfristig das Überleben einer bestimmten Algenart sichern - sondern langfristig die Population eines natürlichen Systems vollkommen verändern. Dies trifft umso mehr zu, als der Mensch durch Veränderung des natürlichen Systems Bedingungen schafft, die eine Verwertung von Sulfonsäuren als Schwefelquelle für vorteilhaft erscheinen lassen.

- Überdüngung der Gewässer mit Phosphat und Nitrat: In vielen eutrophierten Gewässern zeigen nach Untersuchungen unseres Instituts die Algen Symptome eines physiologischen Schwefelmangels. Dieser "Mangelzustand" entsteht v.a. dadurch, daß der natürlich vorkommende Sulfatgehalt mit 0.11-0.18 mM bereits nahe an der unteren Grenze des Bedarfs liegt und bei Massenkulturen unterschritten werden kann (während Phosphat/Nitrat noch in ausreichenden Konzentrationen vorliegen).

- Verschmutzung der Gewässer mit industriellen (Sulfonsäure-)Produkten: In vielen industriell verschmutzten, sulfatarmen Gewässern selektioniert der Mensch auf Sulfonatverwerter, da er über die Art der Verschmutzung im System das Vorkommen dieser Organismen beeinflussen sollte.

Darüber hinaus könnte die Abbaufähigkeit bestimmter Algenarten vom Menschen auch gezielt zur biologischen Abwasserreinigung in Kläranlagen herangezogen werden und einen wichtigen Beitrag zur Entlastung unserer Umwelt leisten.

Voraussetzung für eine solche Abbauleistung wäre im Moment noch die Sulfatarmut des Abwassers, da nach Tab.6-9 die Ausbildung dieser Fähigkeit regulativ an die Abwesenheit von Sulfat gebunden ist. Abhilfe könnte durch züchterische Maßnahmen geschaffen werden, sofern es nicht gelingt Algenarten aufzufinden, die Sulfonatverwertung bereits konstitutiv besitzen.

Aufgrund der Gültigkeit dieses Regulationsprinzips ist die Rolle photosynthetisch aktiver Organismen beim Sulfonatabbau in natürlichen Gewässern relativ schwierig abzuschätzen und äußerst kontrovers zu diskutieren:

So tritt Sulfonsäureverwertung nur in Abwesenheit von Sulfationen bzw. bei partiellem S-Mangel auf. Andererseits herrschen in vielen eutrophierten (s.o.) Gewässern gerade diese Bedingungen vor - ebenso sind Organismen denkbar, die diese Fähigkeit zur koordinierten Regulation verloren/nie besessen haben. Auch besitzen viele der in Tab.4/5 getesteten Organismen nicht die Fähigkeit zum Wachstum auf Sulfonsäuren. Auf der anderen Seite ist die quantitative Verteilung der Algen bezogen auf die Sulfonatverwertung großteils unbekannt. Unbekannt ist auch die Menge an verwertbaren Sulfonsäuren in den Gewässern (einschl.Taurin, Sulfolipiden).

Zusammenfassend scheint damit v.a. Unkenntnis bezüglich Verbreitung und Dimension der Sulfonatverwertung bei aquatisch relevanten Organismen zu bestehen. Die Liste photosynthetischer Organismen, die fähig sind auf ÄSS/Taurin als einziger S-Quelle zu wachsen (Tab.4/5), mag jedoch als guter Anhaltspunkt dafür dienen, bei welchen systematischen Gruppen bevorzugt damit gerechnet werden kann. Wieviele Organismen aber tatsächlich auf Limitierung der Schwefelversorgung neben der "üblicherweise" erhöhten Sulfataufnahme mit Aufnahme/Metabolisierung von Sulfonsäuren reagieren, ist unbekannt. Möglicherweise ging jedoch diese Fähigkeit im Laufe der Evolution mehrfach verloren, so daß fakultative Sulfonatverwerter wie *Chlorella fusca* 211-8b als ursprünglichere Organismen anzusehen wären (größerer Spielraum an verwertbaren Schwefelquellen).

Im Gegensatz zu den Vorteilen, die Sulfonatverwertung für das Überleben der Alge bieten kann (s.o.), erscheint also die Bedeutung dieser Fähigkeit im Rahmen des biologischen Abbaus von Sulfonsäuren noch recht widersprüchlich und benötigt zur Klärung weitere Untersuchungen vor Ort, unter natürlichen Bedingungen.

Insgesamt gesehen, berechtigen jedoch die bisherigen Ergebnisse zu vorsichtigem Optimismus über die Bedeutung der Algen als hochpotente Destruenten im natürlichen System und ihre Rolle bei der Rückführung des Sulfonatschwefels in den globalen Schwefelzyklus. Sie lieferten damit gemeinsam mit heterotrophen Organismen einen wichtigen Beitrag zur Ausbalanzierung des S-Kreislaufs und gewährleisteten die Verfügbarkeit des in Sulfonsäuren enthaltenen Schwefels für lebende Systeme.

E. Zusammenfassung

1. Die Grünalge Chlorella fusca 211-8b wuchs auf zahlreichen Sulfonsäuren als einziger Schwefelquelle im Medium. Zellzahl, Chlorophyll- und Proteingehalt sowie Erscheinungsform waren dabei vergleichbar einer Sulfatkultur. Sulfonatverwertung war jedoch nicht auf Chlorella fusca 211-8b beschränkt sondern trat in vielen der getesteten Grün- und Blaualgen auf, allerdings nicht in höheren Pflanzen oder in anderen Algenstämmen. Ferner variierte diese Fähigkeit relativ stark innerhalb der vorgegebenen systematischen Zuordnungen, und Unterschiede gab es sogar zwischen nah verwandten Arten.
2. Diese Unterschiede in der Sulfonatverwertung konnten durch die Anwesenheit (Abwesenheit) entsprechender Aufnahmesysteme gedeutet werden: Algen, die auf Äthansulfonsäure oder Taurin als einziger Schwefelquelle im Medium wuchsen, entwickelten ein spezifisches Aufnahmesystem für diese Verbindungen. Die Ausbildung des Sulfonsäure-Aufnahmesystems erfolgte jedoch unabhängig von der Gegenwart seines Substrates im Medium (keine Substratinduktion) und war in Sulfatkulturen nicht vorhanden.
Nähere Untersuchungen mit Chlorella fusca zeigten, daß Sulfonsäureaufnahme als spezifische Antwort auf "Sulfat/Schwefel-Mangelbedingungen" angesehen werden muß ("Derepression unter Mangel"). Sulfonataufnahme entwickelte sich ca. 2,5 Stunden nach Umsetzung auf sulfatfreies Medium ("lag-Phase") und bildete sich sofort nach Sulfatzugabe zurück.
3. Das gemeinsame Sulfonsäure-Aufnahmesystem für Äthansulfonsäure und Taurin besaß folgende Charakteristika: pH-Optimum 7,8; Temperaturoptimum 33 °C, Km-Wert von 50-55 µM, Substratspezifität für alle getesteten Sulfonsäuren, nicht jedoch für Monocarbonsäuren und andere Anionen (Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-}). Strukturelles Merkmal für Erkennung/Aufnahme war nur die Anwesenheit einer Sulfonsäuregruppe im Molekül, Präferenzen innerhalb der getesteten Sulfonsäuren gab es nicht: C_1 - C_{10} n-Alkansulfonsäuren, Amino(C_0 - C_3)sulfonate,

sowie Hydroxyl-, Mercapto-, Carboxyl- und Benzylsulfonsäuren konkurrierten untereinander. Das System reagierte sensibel auf Zugabe von CCCP, DCCD, DMBIB, PMSF oder die SH-Gruppen Reagenzien NEM, PCMBs, Cu^{2+} , Hg^{2+} und wurde durch polyvalente Kationen stimuliert. Auch Phosphatzugabe bewirkte eine spezifische Förderung der Sulfonsäureaufnahme.

Das ASS/Taurin-Aufnahmesystem in Chlorella fusca 211-8b stellte somit ein eigenständiges, enzymähnliches, aktives Membrantransportsystem ("Permease") dar. Die Annahme eines generellen Sulfonsäure-Aufnahmesystems stand ferner in Übereinstimmung mit der gezeigten Fähigkeit, auf verschiedenartigen Sulfonsäuren wachsen zu können (Vergleiche mit der Sulfataufnahme wurden durchgeführt, ebenso mit der Taurinaufnahme in Blaualgen und Lemna minor).

4. Gleichzeitig mit diesem Aufnahmesystem entstand die Kompetenz, kurzkettige Sulfonsäuren im Zellinnern zu spalten und den freigesetzten Sulfonatschwefel zu assimilieren. Erstes nachweisbares Abbauprodukt war ^{35}S -Sulfat, das nach längerer Inkubation mit ^{35}S -markierter Äthansulfonsäure/Taurin auch den Hauptteil der wasserlöslichen Radioaktivität in Chlorella fusca bildete. Der Einsatz von ^3H -Taurin erbrachte den Nachweis markierter Spaltprodukte auf der C-Seite, z.B. das Kurzzeitprodukt Äthanolamin. Daneben wurden über DC/DE-Analysen weitere Metabolisierungsprodukte des S- und C-Stoffwechsels nachgewiesen: ^{35}S -markiertes Glutathion, Cystein, Methionin, Sulfolipid, ^3H -Phosphatidyläthanolamin, Aminoäthylphosphat. Als Reaktionsmechanismus des Sulfonsäureabbaus wurde eine Art oxidativ-hydrolytische Spaltung der C-S Bindung unter Bildung von Sulfat/des entsprechenden Alkohols postuliert. (Der Unterschied zum Sulfonsäureabbau in Anabaena variabilis wurde gezeigt).
5. Die β -Aminosäure Taurin wurde unabhängig zur Äthansulfonsäure auch unter N-Mangelbedingungen aufgenommen. Die Besonderheiten dieses Aufnahmemodus in Chlorella fusca deuteten auf die Aktion einer generellen Aminosäure-Permease unter N-Limitierung: Substratspezifität für Aminosäuren, nicht jedoch für Sulfonsäuren, pH-Optimum bei 4.8 und ein K_m -Wert von 1.1 mM. Auch dieses Aufnahmesystem war nicht konstitutiv in nitratgewachsenen Algen vorhanden sondern entwickelte sich nach einer lag-Phase von mehr als 8 Stunden nach Umsetzung auf N-Mangelmedium. Gleichzeitig zeigte die Alge auf Nitrat-Mangelmedium trotz Gegenwart von Taurin N-Mangelsymptome, da sie nicht in der Lage war, diese β -Aminosäure unter N-Mangelbedingungen abzubauen und den freigesetzten Stickstoff zu nutzen.
6. Chlorella fusca reagierte sehr sensibel auf Veränderungen des umgebenden (Kultur-)Mediums. So zeigte sie trotz fehlender äußerer Mangelsymptome

bei Wachstum auf Sulfonsäuren ein verändertes Aufnahmeverhalten und von Sulfatkulturen abweichende Enzymaktivitäten des S- und N-Stoffwechsels. Auch Zugabe/Entzug von Schwefelquellen oder S/N-Mangel unterschiedlichen Ausmaßes wurden von der Alge mit einer Fülle enzymatischer Umsteuerungen und gezielter Reaktionen beantwortet.

7. Diese Umsteuerungen wurden als Ausdruck von S/N-Mangelstrategien gedeutet, entwickelt im Laufe der Evolution, um ein Überleben der Algenzelle auch auf erniedrigtem Sulfat/Nitratgehalt sichern zu können ("Notsituationen"). In dieser Hierarchie von Notfallmechanismen stellte Wachstum auf Sulfonaten (bzw. Aufnahme/Metabolisierung von Sulfonsäuren) einen wichtigen Teil der S-Mangelstrategie der Alge dar und wurde neben Steigerung der Sulfataufnahme als wichtige Maßnahme (hohe Priorität) zur Überwindung des S-Mangelstadiums angesehen. Taurinaufnahme bei N-Mangel wurde dagegen nur als Unspezifität des generellen Aminosäure-Transportsystems interpretiert, da Taurin nicht als N-Quelle verwertet werden kann (Unspezifische Reaktionen auf S/N-Mangel wurden ebenfalls diskutiert und in ihrer Bedeutung herausgestellt).
8. Die Verwertung von S-Verbindungen wurde sowohl von der oxidativen Seite des S-Stoffwechsels (Sulfat(pool), Sulfatester, Sulfolipid) wie von der reduktiven Seite (Cystein ?) gesteuert. Diese Regulationsmöglichkeiten konnten durch Anzucht auf S-haltigen Verbindungen (bei Fehlen von Sulfat) unterschieden werden. So zeigte die Alge in Abhängigkeit von herrschenden (S-)Ernährungsbedingungen (mindestens) drei verschiedene Erscheinungsformen, die reversibel ineinander übergehen können: Sulfatform, Sulfatmangelform und Schwefelmangelform. Beschreibung und Unterscheidung dieser Formen ("Status") wurden durchgeführt und als Umsteuerungen der Algenzelle gedeutet. So zeigten Algen, die auf Sulfonsäuren als einziger Schwefelquelle wuchsen, eine Art "Sulfat-Mangelsyndrom" (abgesenkter Sulfatpool ?), während sie bei fehlender S-Ernährung ein andersartiges "Schwefel-Mangelsyndrom" aufwiesen: Chlorose, Proteinmangel, Akkumulation von löslichen N-Verbindungen (v.a. Arginin), erhöhter Stärke- und Fettgehalt sowie die Erhöhung gewisser Enzymaktivitäten des S-Stoffwechsels (Thiosulfatreduktase). Diese Mangelsymptome wurden durch Mangel an reduzierten Verbindungen hervorgerufen und verschwanden nach Zugabe einer metabolisierbaren Schwefelquelle. Die Unterscheidung reduktiver und oxidativer Signale des S-Stoffwechsels wurde durch limitierte Oxidationskapazitäten für reduzierte S-Verbindungen ermöglicht und erlaubte zum ersten Mal, den Nachweis für regulatorische Signale auf der oxidativen Seite des S-Stoffwechsels zu führen, ohne jedoch S-Mangel zu provozieren (Der Begriff "Substratrepression" wurde definiert).

F. Literaturverzeichnis

- 1 AACH, H.G.: Über Wachstum und Zusammensetzung von Chlorella pyrenoidosa bei unterschiedlichen Lichtstärken und Nitratmengen.
Arch. Mikrobiol. 17, 213-246, 1952
- 2 AHTEE, L.; D.J.BOULLIN und M.K.PAASONEN: Transport of taurine by normal human blood platelets. Br.J.Pharmac. 52, 245-251, 1974
- 3 ALLEN, M.B.: Studies with Cyanidium caldarium, an anomalously pigmented chlorophyte. Arch. Mikrobiol. 32, 270-277, 1959
- 4 ANDERSON, R.; M.KATES und R.L.VOLCANI: Identification of the sulfolipids in the non-photosynthetic diatom Nitzschia alba.
Biochim. Biophys. Acta 528, 89-109, 1978
- 5 ARNON, D.I.: Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidases in Beta vulgaris. Plant Physiol. 24, 1-15, 1949
- 6 ATKINSON, A.W.; B.E.S.GUNNING und P.C.L.JOHN: Sporopollenin in the cell wall of Chlorella and other algae: Ultrastructure, chemistry and incorporation of ¹⁴C-acetate, studied in synchronous cultures.
Planta 107, 1-32, 1972
- 7 AZOV, Y.; G.SHELER und N.NARKIS: Effect of hard detergents on algae in a high-rate-oxidation pond. Appl.Environ.Mikrobiol. 43, 491-492, 1982
- 8 BAJUSZ, J.; A.Z.RONAI; A.TURAN; A.JOHASZ; A.PATTHY; E.MIGLECZ und I.BERZETEI: Enkephalin analogs containing amino sulfonic acid and amino phosphonic acid residues at position 5.
FEBS Letters 117, 308-310, 1980

- 9 BARZILAY, M.; S.SHIP und Z.I.CABANTCHIK: Structure-activity relationship of aromatic sulfonic acids as inhibitors of the anion transport system of human RBC. *Biophys.J.* 21, 71a, 1978
- 10 BERGMANN, K.: Stoffwechsel und Mineralsalzernährung einzelliger Grünalgen. II. Vergleichende Untersuchungen über den Einfluß mineralischer Faktoren bei heterotropher und mixotropher Ernährung. *Flora* 142, 493-539, 1955
- 11 BERSIN, T.: Die Phytochemie des Schwefels. *Adv.Enzymol.* 10, 233-323, 1960
- 12 BIEBER, E.J. und B.J.WILKINSON: Sodium-dependent uptake of taurine in encapsulated Staphylococcus aureus, strain M. *Biochim.Biophys.Acta* 770, 127-135, 1984
- 13 BIEDLINGMAIER, S. und A.SCHMIDT: Alkylsulfonic acids and some S-containing detergents as sulfur sources for growth of Chlorella fusca. *Arch.Microbiol.* 136, 124-130, 1983
- 14 BLACHLEY, J.D.; J.H.JOHNSON und J.P.KNOCHEL: Review: The harmful effects of ethanol on ion transports and cellular respiration. *Amer.J.Med. Sci* 289, 22-26, 1985
- 15 BLUM, J.J.: Phosphate uptake by phosphate-starved Euglena. *J.Gen.Physiol.* 49, 1125-1137, 1966
- 16 BONSEN, P.P.M.; J.A.SPUDICH; D.L.NELSON und A.KORNBERG: Biochemical studies of bacterial sporulation and germination. XII. A sulfonic acid as a major sulfur compound of Bacillus subtilis spores. *J.Bacteriol.* 98, 62-68, 1969
- 17 BOTTACIN, A.; K.SMITH; B.J.MIFLIN; P.R.SHEWRY und S.W.J.BRIGHT: Regulation of storage protein synthesis by sulfur and nitrogen nutrition in cultured immature caryopses of barley. *J.Exp.Bot.* 36, 140-148, 1985
- 18 BOWMAN, E.J.: Comparison of the vacuolar membrane ATPase of Neurospora crassa with the mitochondrial and plasma membrane ATPases. *J.Biol.Chem.* 258(24), 15238-15244, 1983
- 19 BRADFIELD, G.; P.SOMERFIELD; T.MEYN; M.HOLBY; D.BABCOCK; D.BRADLEY und I.H. SEGEL: Regulation of sulfate transport in filamentous fungi. *Plant Physiol.* 46, 720-727, 1970

- 20 BRADFORD, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72, 248-254, 1976
- 21 BRAUN, R. und P.FROMAGEOT: Désamination de la taurine par Aspergillus niger. *Biochim. Biophys. Acta* 62, 548-555, 1962
- 22 BRESCH(C.)-HAUSMANN(R.) : Klassische und molekulare Genetik. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1972, pp.279-320
- 23 BRETON, M.; C.WOLF und O.COLARD: Linoleate incorporation into rat liver membranes phospholipids: Effect on plasma membrane ATPase activities and physical properties. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 117, 809-816, 1983
- 24 BRIDGER, W.A. und W.PARANCHYCH: Guanosine tetraphosphate: Coordinator of metabolic response to nitrogen starvation in enterobacteria. *Trends Biochem. Sci.* 4, 176-179, 1982
- 25 BRUNOLD, C. und K.H.ERISMANN: H₂S als Schwefelquelle bei Lemna minor. Einfluß auf das Wachstum, den Schwefelgehalt und die Sulfataufnahme. *Experientia* 30, 465-467, 1974
- 26 BRUNOLD, C. und J.A.SCHIFF: Studies of sulfate utilization by algae. 15. Enzymes of assimilatory sulfate reduction in Euglena and their cellular localization. *Plant Physiol.* 57, 430-436, 1976
- 27 BRUNOLD, C. und A.Schmidt: Regulation of sulfate assimilation in plants. 7. Cysteine inactivation of adenosine-5'phosphosulfate sulfo-transferase in Lemna minor: *Plant Physiol.* 61, 342-347, 1978
- 28 BUCHANAN, B.B.; P.SCHÜRMANN und P.P.KALBERER: Ferredoxin-activated fructose diphosphatase of spinach chloroplasts. Resolution of the system, properties of the alkaline fructose diphosphatase component, and physiological significance of the ferredoxin-linked activation. *J.Biol.Chem.* 246(19), 5952-5959, 1971
- 29 BURNELL, J.N. und F.R.WHATLEY: Regulation of sulfur metabolism in Paracoccus denitrificans. *J.Gen.Microbiol.* 118, 73-78, 1980
- 30 BUSBY, W.F.: Sulfopropanediol and cysteinolic acid in the diatom. *Biochim. Biophys. Acta* 121, 160-161, 1968

- 31 BUTZ, R.G. und W.A.JACKSON: A mechanism for nitrate transport and reduction. *Phytochemistry* 16, 409-417, 1977
- 32 CABANTCHIK, Z.I. und A.ROTHSTEIN: The nature of the membrane sites controlling anion permeability of human red blood cells as determined by studies with disulfonic stilbene derivatives. *J.Membrane Biol.* 10, 311-330, 1972
- 33 CAIN, R.B. und D.R.FARR: Metabolism of arylsulfonates by micro-organisms. *Biochem. J.* 106, 859-877, 1968
- 34 CHO, B.H. und E.KOMOR: Mechanisms of proline uptake by *Chlorella vulgaris*. *Biochim.Biophys.Acta* 735, 361-366, 1983
- 35 CHRISTEN, H.R.: Grundlagen der organischen Chemie. Verlag Sauerländer Diesterweg-Salle. 4.Auflage 1977.
- 36 CLARKSON, D.T.; F.W.SMITH und P.J.VANDEN BERG: Regulation of sulfate transport in a tropical legume, *Macroptilium atropurpureum*, c.v. Sirartro. *J.Exp.Bot.* 34, 1463-1483, 1983
- 37 CONRAD, H.E.; R.DuBUS und I.C.GUNSALUS: An enzyme system for cyclic ketene lactonization. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 6, 293-297, 1961
- 38 CONWAY, E.J.: Microdiffusion analysis and volumetric error. Crosby Lockwood, London 1957
- 39 COOK, A.M. und R.HÜTTER: Ametryne and prometryne as sulfur sources for bacteria. *Appl.Environ.Microbiol.* 43, 781-786, 1982
- 40 COYNE, C.M. und G.A.MAW: The paper chromatography of aliphatic sulfonates. *J.Chromatog.* 14, 552-555, 1969
- 41 CRC Handbook Series in Nutrition and Food. M.Rechcigl (Ed.). Section G: Diets, culture media, food supplements, Volume III - Culture media for microorganisms and plants. CRC Press, Ohio, Cleveland 1978, p.284
- 42 CRAM, W.J.: Sulfate accumulation is regulated at the tonoplast. *Plant Sci.Lett.* 31, 329-338, 1983
- 43 CRANDALL, M. und L.J.LAWRENCE: Sporulation in *Hansenula wingei* is induced by nitrogen starvation in maltose-containing media. *J.Bact.* 142, 276-284, 1980

- 44 CUHEL, R.L.; C.D.TAYLOR und H.W.JANNASCH: Assimilatory sulfur metabolism in marine microorganisms: Sulfur metabolism, growth and protein synthesis of Pseudomonas halodurans and Alteromonas luteo-violaceus during sulfate limitation. Arch.Microbiol. 130, 1-7, 1981
- 45 CULLIMORE, J.V.: Glutamine synthetase of Chlamydomonas: Rapid reversible desactivation. Planta 152, 587-591, 1981
- 46 CUPPOLETTI, J. und I.H.SEGEL: Kinetics of sulfate transport by Penicillium notatum. Interactions of sulfate, protons and calcium. Biochem. 14, 4712-4718, 1975
- 47 CZYGAN, F.C.: Sekundär-Carotinoide in Grünalgen. I.Chemie, Vorkommen und Faktoren, welche die Bildung dieser Polyene beeinflussen. Arch.Mikrobiol. 61, 81-102, 1968
- 48 DAHL, J.L. und L.E.HOKIN: The sodium-potassium adenosinetriphosphatase. Ann.Rev.Biochem. 43, 327-357, 1974
- 49 DATKO, A.H.; S.H.MUDD; J.GIOVANELLI und P.K.MACNICOL: Sulfur-containing compounds in Lemna perpusilla 6746 grown at a range of sulfate concentrations. Plant Physiol. 62, 629-635, 1978
- 50 DATKO, A.H. und S.H.MUDD: Sulfate uptake and its regulation in Lemna paucicostata Hegelm.6746. Plant Physiol. 75, 466-473, 1978
- 51 DAUGHTON, C.G.; A.M.COOK und M.ALEXANDER: Biodegradation of phosphonates toxicants yields methane or ethane on cleavage the C-P bond. FEMS Microbiol.Lett. 5, 91-93, 1979
- 52 DEANE, E.M. und R.W.O'BRIEN: Sulfate uptake and metabolism in the Chrysomonad Monochrysis lutheri. Arch.Microbiol. 105, 293-301, 1975
- 53 DEUTECKE, B.: Monocarboxylate transport in erythrocytes. J.Membrane Biol. 70, 88-103, 1982
- 54 DIXON, M. und E.C.WEBB: Enzymes. Second Edition, Longmans 1964
- 55 DODGSON, K. und G.WHITE: Sulfatases of microbial origine. Volume II. Mechanisms of enzymatic and nonenzymatic hydrolysis of sulfate esters. CRC Press, Boca Raton, Florida 1982, pp.19-71

- 56 DREYFUSS, J.: Characterization of a sulfate and thiosulfate-transporting system in Salmonella typhimurium.
J.Biol.Chem. 239(7), 2292-2297, 1964
- 57 DUNHAM, S.M. und C.F.THURSTON: Control of isocitrate lyase synthesis in Chlorella fusca, var.vacuolata. Rate of enzyme synthesis in the presence and absence of acetate measured by ³⁵S-methionin labelling and immunoprecipitation.
Biochem.J. 176, 179-185, 1978
- 58 ENDO, K.; H.KONDO und M.ISHIMOTO: Degradation of benzene sulfonate to sulfite in bacterial extracts. J.Biochem. 82, 1397-1402, 1977
- 59 FAROOQUI, A.A.; Samiullah und M.M.R.K.AFRIDI: Arylsulfatase activity of corn (Zea mays L.) seedling roots. Planta 133, 157-160, 1977
- 60 FELLE, H.: Stereospecificity and electrogenicity of amino acid transport in Riccia fluitans. Planta 152, 505-512, 1981
- 61 FENZL, F.; M.DECKER, D.HAASS und W.TANNER: Characterization and partial purification of an inducible protein related to hexose proton cotransport of Chlorella vulgaris.
Eur.J.Biochem. 72, 509-514, 1977
- 62 FERGUSON, A.R. und A.P.SIMS: Inactivation in vivo of glutamine synthetase and NAD-specific glutamate dehydrogenase: Its role in the regulation of glutamine synthesis in yeast.
J.Gen.Microbiol. 69, 423-427, 1971
- 63 FLORENCIO, F.J. und J.M.VEGA: Utilization of nitrate, nitrite and ammonium by Chlamydomonas reinhardtii. Photoproduction of ammonium.
Planta 158, 288-293, 1983
- 64 FRIGA, G.M.; G.BORBELY und G.K.FARKAS: Accumulation of guanosine tetra-phosphate (ppGpp) unter nitrogen starvation in Anacystis nidulans, a Cyanobacterium. Arch.Microbiol. 129, 341-343, 1981
- 65 FURNER, I.J. und Z.R.SUNG: Regulation of sulfate uptake in carrot cells: Properties of a hypercontrolled variant.
Proc.Natl.Acad.Sci USA 79, 1149-1153, 1982
- 66 GAAL, J.C. und C.K.PEARSON: Covalent modification of proteins by ADP-ribosylation. Trends Biochem.Sci. 11, 171-175, 1986

- 67 GALLOWAY, R.A. und R.W.KRAUSS: Utilization of phosphorus sources by Chlorella. In: Microalgae & Photosynthetic Bacteria, Special issue of Plant and Cell Physiology, Japanese Society of Plant Physiologists (Ed.). The University of Tokyo Press 1963, pp, 569-575
- 68 GAMON, B.: Untersuchungen zur Thiosulfat-Spaltung durch Rhodanesen und Thiosulfat-Reduktasen aus der Grünalge Chlorella fusca, Diplomarbeit, München 1983
- 69 GIOVANELLI, J.; S.H.MUDD und A.H.DATKO: Homocysteine biosynthesis in green plants. Physiological importance of the transsulfuration pathway in Chlorella sorokiniana grown under steady state conditions with limiting sulfate. J.Biol.Chem. 253(16), 5665-5677, 1978
- 70 GODCHAUX III, L. und E.L.LEADBETTER: Capnocytophaga spp. contain sulfonolipids that are novel in procaryotes. J.Bact.144, 592-602, 1980
- 71 GREENBLATT, C.L. und J.A.SCHIFF: A pheophytin like pigment in dark adapted Euglena gracilis. J.Protozool. 6, 23-28, 1959
- 72 GROSSO, D.S.; W.R.ROESKE und R.BRESSLER: Characterization of a carrier-mediated transport system for taurine in the fetal mouse heart in vitro. J.Clin. Invest. 61, 944-952, 1978
- 73 GUIGNARD, R.; F.GRANGE und G.TURIAN: Microcycle conidiation of Neurospora crassa by partial nitrogen deprivation. Experientia 39, 1434, 1983
- 74 GUNDLACH, G.; A.KÄBISCH; R.VOEGELI; H.PRALLE und S.HARTENFELS: Determination of phosphoethanolamine in urine or in the presence of high taurine concentration. Analyt.Biochem. 142, 511-514, 1984
- 75 HAASS, D. und W.TANNER: Regulation of hexose transport in Chlorella vulgaris. Characteristics of induction and turnover. Plant Physiol. 53, 14-20, 1974
- 76 HALL, D.I. und I.K.SMITH: Partial purification and characterization of cystine lyase from cabbage (Brassica oleracea var. capitata). Plant Physiol. 72, 654-658, 1983
- 77 HARDISON, W.G.M. und R.WEINER: Taurine transport by rat hepatocytes in primary cultures. Biochim. Biophys. Acta 598, 142-152, 1980

- 78 HARRIS, C.L.: Sulfur-deficient t-RNA and the regulation of the *ilv* EDA operon in Escherichia coli C6. Fed.Proc. 39(6), 1874, 1980
- 79 HARWOOD, J.L. und R.G.NICHOLLS: The plant sulfolipid - a major component of the sulfur cycle. Biochem.Rev. 48, 449-447, 1979
- 80 HARWOOD, J.L.: Sulfolipids. In: The Biochemistry of Plants, Vol 4. Lipids: Structure and Function. P.K.Stumpf (Ed.). Academic Press New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco 1980, pp.301-320
- 81 HATAKEYAMA, S.; M.OKUDA und H.AKIMOTO: Formation of sulfur dioxide and methanesulfonic acid in the photooxidation of dimethyl sulfide in the air. Geophys.Res.Lett. 9, 583-586, 1982
- 82 HECHT, S.M.; N.J.LEONARD; J.OCCOLOWITZ; W.J.BURROWS; D.J.ARMSTRONG; F.SKOOG; R.M.BOCK; I.GILLAM und G.M.TENER: Cytokinins: Isolation and identification of 6-(3-methyl-2-butenylamino)-9- β -D-ribofuranosylpurine (2iPA) from yeast cysteine t-RNA. Biochem.Biophys.Res.Comm. 35, 205-209, 1969
- 83 HELDT, H.W. und L.RAPLEY: Specific transport of inorganic phosphate, 3-phosphoglycerate and dihydroxyacetonephosphate and of dicarboxylates across the inner membrane of spinach chloroplasts. FEBS Lett. 10, 143-148, 1970
- 84 HELLEBUST, J.A. und J.LEWIN: Transport systems for organic acids induced in the marine pennate diatom, Cylindrotheca fusiformis. Can.J.Microbiol. 18, 225-233, 1972
- 85 HELLER, M.J.; J.A.WALDER und I.M.KLOTZ: Intramolecular catalysis acylation and deacylation in peptides containing cysteine and histidine. J.Am.Chem.Soc. 99, 2780-2785, 1977
- 86 HENKEL, K.: Waschmittelchemie. Dr.A.Hütig Verlag, Heidelberg 1976
- 87 HENKELMANN, G.: Quantitative Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung von Synechococcus 6301 bei verschiedenen Wachstumsbedingungen unter Berücksichtigung anderer zellulärer Bestandteile und morphologischer Daten. Diplomarbeit, München 1984
- 88 HILZ, H.: ADP-ribosylation of proteins - a multifunctional process. Hoppe-Seylers's Z.Physiol.Chem. 362, 1415-1425, 1981

- 89 HODSON, R.C.; J.A.SCHIFF und J.P.MATHER: Studies of sulfate utilization by algae. 10. Nutritional and enzymatic characterization of Chlorella mutants impaired for sulfate utilization. Plant Physiol. 47, 306-311, 1971
- 90 HOLOWACH, L.P.; J.F.THOMPSON und J.T.MADISON: Storage protein composition and soybean cotyledons grown in vitro in media of various sulfate concentration in the presence and absence of exogenous L-methionine. Plant Physiol. 74, 684-589, 1984
- 91 HOULTON, H.G. und H.V.TARTAR: Raman spectra of sodium alkylsulfonates and sulfinates. J.Amer.Chem.Soc. 60, 544-548, 1938
- 92 HUNTER, D.R. und I.H.SEGEL: Acidic and basic amino acid transport systems of Penicillium chrysogenum. Arch.Biochem.Biophys.144, 169-183, 1971
- 93 IKEDA, K.; H.YAMADA und S.TANAKA: Bacterial degradation of taurine. J.Biochem. 54, 312-316, 1963
- 94 JACOBSON, G.J. und L.H.SMITH: Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. Physiol.Rev. 48, 424-511, 1968
- 95 JEANJEAN, R. und E.BRODA: Dependence of sulfate uptake by Anacystis nidulans on energy, on osmotic shock and on sulfate starvation. Arch. Microbiol. 114, 19-23, 1977
- 96 JENSEN, P. und T.KÖNIG: Development of regulation mechanisms for SO_4^{2-} influx in spring wheat roots. Physiol.Plant.55, 459-464, 1982
- 97 JOHNSTON, J.B.; K.MURRAY und R.B.CAIN: Microbial metabolism of aryl sulfonates. A re-assessment of colorimetric methods for the determination of sulfite and their use in measuring desulfonation of aryl and alkylbenzene sulfonates. Antonie van Leeuwenhoek, J.Microbiol.Serol. 41, 493-511, 1975
- 98 JONES, S.L. und I.K.SMITH: Sulfate transport in cultured tobacco cells. Effect of calcium and sulfate concentration. Plant Physiol. 67, 445-448, 1981
- 99 KATES, M.: Plant phospholipids and glycolipids. Adv.Lipid.Res. 8, 225-265, 1970
- 100 KELLY, A.P. und L.L.WEED: Taurine as a constituent of a bacterial cell wall. J.Biol.Chem. 240(6), 2519-2523, 1965

- 101 KENNEDY, A.J. und M.J.VOADEN: Studies on the uptake and release of radioactive taurine by the frog retina.
J.Neurochem. 27, 131-137, 1976
- 102 KIRK, D.L. und M.M.KIRK: Carrier-mediated uptake of arginine and urea by Chlamydomonas reinhardtii. Plant Physiol. 61, 556-560, 1978
- 103 K LAPHECK, S.; W.GROSSE und L.BERGANN: Effect of sulfur deficiency on protein synthesis and amino acid accumulation in cell suspension cultures of Nicotiana tabacum.
Z.Pflanzenphysiol. 108, 235-245, 1982
- 104 KNUTSEN, G.: Pool control of uracil uptake by synchronous Chlorella.
Physiol. Plant. 28, 317-319, 1973
- 105 KÖST, E.: Untersuchungen zur Protein-Chromophor-Bindung unter Verwendung der radioaktiven Markierung mit ³⁵S am Beispiel von B-Phycocerythrin aus Porphyridium cruentum. Thesis, München 1978
- 106 KOMOR, R.; C.SCHOBERT und B.-H.CHO: The hexose uptake system of Chlorella: Is it a proton symport or a hydroxyl ion antiport system ?
FEBS Lett. 156, 6-10, 1983
- 107 KONDO, H.; H.ANADA; K.OHSAWA und M.ISHIMOTO: Formation of sulfoacetaldehyde from taurine in bacterial extracts.
J.Biochem. 69, 621-623, 1971
- 108 KONDO, H. und M.ISHIMOTO: Enzymatic formation of sulfite and acetate from sulfoacetaldehyde, a degradation product of taurine.
J.Biochem. 72, 487-489, 1972
- 109 KONDO, H.; K.KAGOTANI; M.OSHIMA und M.ISHIMOTO: Purification and some properties of a taurine dehydrogenase from a bacterium.
J.Biochem. 73, 1269-1278, 1973
- 110 KONDO, H. und M.ISHIMOTO: Purification and properties of sulfoacetaldehyde sulfo-lyase, a thiamin pyrophosphate-dependent enzyme forming sulfite and acetate. J.Biochem. 78, 317-325, 1975
- 111 KOSHIKAWA, T.; S.NAKASHIO; K.KAZUHIRO; T.ICHIKAWA und M.KONDO: Presence of cysteic acid in the sporangium and its metabolic pathway during sporulation of Bacillus subtilis NRRL B558.
J.Gen.Microbiol. 124, 415-423, 1981

- 112 KRÄMER, E.: Nachweis und Charakterisierung von membrangebundenen Cysteinooxidasen aus der Grünalge Chlorella fusca und der Blaualge Synechococcus 6301. Diplomarbeit, München 1983
- 113 KRAUSS, K.F.: Funktion, Eigenschaften und Regulation der multifunktionalen Cysteinsynthase und einiger am Cysteinestoffwechsel beteiligter Enzyme beim Wachstum von Chlorella fusca auf verschiedenen schwefelhaltigen Verbindungen. Thesis, München 1984
- 114 KUDIELKA, R.A. und R.R.THEIMER: Somatic embryogenesis in anise (Pimpinella anisum L.) cell cultures in microgravity environment. Proc.Workshop Space Biology, Cologne 1983, pp.63-68
- 115 KURIYAMA, K.; M.MURAMATSU; Y.YONEDA und K.KAKITA: Possible role of taurine as a modulator of membrane excitability. J.Cell.Biol 75(2), 104, 1977
- 116 LANGMÜLLER, G. und H.SPRINGER-LEDERER: Membranpotential von Chlorella fusca in Abhängigkeit von pH-Wert, Temperatur und Belichtung. Planta 120, 189-196, 1974
- 117 LANYI, J.K.: The role of Na⁺ in transport processes of bacterial membranes. Biochim.Biophys. Acta 559, 377-397, 1979
- 118 LAYCOCK, M.V.; A.G.McINNES und K.C.MORGAN: D-Homocysteic acid from Palmaria palmata. Phytochem. 18, 1220, 1979
- 119 LEE, R.B.: Selectivity and kinetics of ion uptake by barley plants following nutrient deficiency. Ann.Bot. 50, 429-449, 1982
- 120 LEE, R.F. und A.A.BENSON: The metabolism of glyceryl ³⁵S-sulfoquinovoside by the coral tree, Erythrina crista-galli, and alfalfa Medicago sativa. Biochim.Biophys.Acta 261, 35-37, 1972
- 121 LEIDNER, H.; R.GLOOR; D.WÜEST und K.WUHRMANN: The influence of the sulfonic group on the biodegradability of n-alkylbenzene sulfonates. Xenobiotica 10, 47-56, 1980
- 122 LIAU, D.-F.; M.A.MELLY und J.H.HASH: Surface of polysaccharide from Staphylococcus aureus M that contains taurine, D-aminogalacturonic acid and D-fucosamine. J.Bact. 119, 913-922, 1974

- 123 LICHTLE, C.: Effect of nitrogen deficiency and light of high intensity on Cryptomonas refuescens (Cryptophyceae). 1. Cell and photo-synthetic apparatus transformations and encystment. Protoplasma 101, 283-299, 1979
- 124 LINDBERG, B.: Methylated taurins and cholin sulfate in red algae. Acta Chem.Scand. 9, 1323-1326, 1955
- 125 LOWENDORF, H.S.; G.F.BAZINET und C.W.SLAYMAN: Phosphate transport in Neurospora. Derepression of a high-affinity transport system during phosphorus starvation. Biochim.Biophys.Acta 389, 541-549, 1975
- 126 MAGGIONI, A. und R.RENOSTO: Cysteine and methionine regulation of sulfate uptake in potato tuber disks (Solanum tuberosum). Physiol.Plant. 39, 143-147, 1977
- 127 MALEK, L. und E.A.COSSINS: Aminoacylation of t-RNA and protein turnover in nitrate-and sulfate-deficient Spirodela polyrrhiza. Plant & Cell Physiol. 24, 1353-1359, 1983
- 128 MARCUS, Y.; D.ZENVIRTH; E.HAREL und A.KAPLAN: Induction of HCO_3^- transport capability and high photosynthetic affinity to inorganic carbon by low concentration of CO_2 in Anabaena variabilis. Plant Physiol. 69, 1008-1012, 1982
- 129 MARTELLI, H.L. und A.A.BENSON: Sulfocarbohydrate metabolism. I Bacterial production and utilization of sulfoacetate. Biochim.Biophys.Acta 93, 169-171, 1964
- 130 MARTINEAU, R.; M.KOHLBACHER; S.N.SHAW und H.AMOS: Enhancement of hexose entry into chick fibroblasts by starvation. Differential effects on galactose and glucose. Proc.Natl.Acad.Sci USA 69, 3407-3411, 1972
- 131 MAZZARA, G.P. und W.H.McCLAIN: Cysteine transfer RNA of Escherichia coli: Nucleotide sequence and unusual metabolic properties of the 3' C-C-A terminus. J.Mol. Biol. 117, 1061-1979. 1977
- 132 McLACHLAN, J.: The culture of Dunaliella tertiolecta Butcher, a euryhaline organism. Can.J.Microbiol. 6, 367-379, 1960

- 133 MENON, V.K.N. und A.K.VARMA: Sulfate uptake in the cyanobacterium Spirulina platensis. FEMS Microbiol.Lett. 13, 141-146, 1982
- 134 MULLARD, P. und L.V.EVANS: Sulfate uptake in the unicellular marine red alga Rhodella maculata. Arch.Microbiol.131, 165-169, 1982
- 135 MINARIK, E. und A.NAVARA: Der Einfluß von Methionin und Cystein auf die Sulfataufnahme und Sulfitbildung durch einige Sacharomyces-Arten. Biologia 28, 955-960, 1973
- 136 MIYACHI, S. und H.TAMIYA: Distribution and turnover of phosphate compounds in growing Chlorella cells. Plant & Cell Physiol. 2, 405-414, 1961
- 137 MONHEIMER, R.H.: Effect of three environmental variables on sulfate uptake by aerobic bacteria. Appl.Microbiol. 30, 975-981, 1975
- 138 MOSS, D.E. und D.FAHRNEY: Kinetic analysis of differences in brain acetylcholinesterase from fish or mammalian sources. Biochem.Pharmac. 27, 2693-2698, 1978
- 139 MUMMERT, H.: U.-P.HANSEN und D.GRADMANN: Current-voltage curve of electrogenic Cl^- pump predicts voltage-dependend Cl^- efflux in Acetabularia. J.Membrane Biol. 62, 139-148, 1981
- 140 NAKASHIO, S.: T.NAKANISHI; I.KOSHIKAWA; T.ICHIKAWA und M.KONDO: Identification of taurine occuring in sporulating cells of Bacillus subtilis. Microbios 33, 73-80, 1982
- 141 NIEDERMAYER, I.: Arylsulfataseaktivität in Chlorella fusca: Ihre Regulation durch Derepression bei Schwefelmangel. Diplomarbeit, München 1985
- 142 NISSEN, P.: Uptake of sulfate by roots and leaf slices of barley: Mediated by single, multiphasic mechanisms. Physiol.Plant. 24, 315-324, 1971
- 143 NORRIS, D.E. und P.W.TRUDGILL: The metabolism of cyclohexanol by Nocardia globerula CL 1. Biochem.J.121, 363-370, 1971
- 144 NORTH, B.B. und G.C.STEPHENS: Uptake and assimilation of amino acids by Platymonas. II. Increased uptake in nitrogen-deficient cells. Biol.Bull. 140, 242-254, 1971

- 145 NOVACKY, A.; C.I. ULLRICH-EBERIUS und U.LÜTTGE: pH and membrane-potential changes during glucose uptake in Lemna gibba G₁ and their responses to light. *Planta* 149, 321-326, 1980
- 146 Organikum. Organisch-chemisches Grundpraktikum.
VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1974
- 147 PACHMAYR, R.: Vorkommen und Bestimmung von Schwefelverbindungen im Mineralwasser. Thesis, München 1960
- 148 PAONE, D.A.M. und S.E.STEVENS Jr.: Nitrogen starvation and the regulation of glutamine synthetase in Agmenellum quadruplicatum. *Plant Physiol.* 67, 1097-1100, 1981
- 149 PAYNE, W.J. und V.E.FEISAL: Bacterial utilization of dodecyl sulfate and dodecyl benzene sulfonate.
Appl.Microbiol. 11, 339-344, 1963
- 150 PETTERSON, R. und G.KNUTSEN: Uptake of guanine by synchronized Chlorella fusca. *Arch.Microbiol.* 96, 233-246, 1974
- 151 PEUKERT, A.: Nachweis und Charakterisierung von membranassoziierter Sulfitoxidaseaktivität bei der Grünalge Chlorella fusca.
Diplomarbeit, München 1985
- 152 PIENIAZEK, N.J.; P.P.STEPIEN und A.PASZEWSKI: An Aspergillus nidulans mutant lacking cystathionine β -synthase: Identity of L-serine sulphydrylase with cystathionine β -synthase and its distinctness from O-Acetyl-L-Serine sulphydrylase.
Biochim.Biophys.Acta 297, 34-47, 1973
- 153 PISTORIUS, E.K.; E.A.FUNKHOUSER und H.VOSS: Effect of ammonium and ferricyanide on nitrate utilization by Chlorella vulgaris.
Planta 141, 279-282, 1978
- 154 PLENNART, W. und W.HEINE: Normalwerte, 4.Auflage.
VEB Verlag, Volk und Gesundheit, Berlin 1973
- 155 POSTMA, P.W. und S.ROSEMAN: The bacterial phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system.
Biochim.Biophys.Acta 457, 213-257, 1976

- 156 PRZYTOCKA-JUSIAK, M.; M.DUSZOTA; M.MATUSIAK und R.MYCIELSKI: Intensive culture of Chlorella vulgaris/AA as the second stage of biological purification of nitrogen industry wastewaters. Water Res. 18, 1-7, 1984
- 157 RAMOS, E.H.; L.C.de BONGIOANNI und A.O.M.STOPPANI: Kinetics of L-¹⁴C-leucine transport in Saccharomyces cerevisiae. Effect of energy coupling inhibitors. Biochim.Biophys.Acta 559, 214-231, 1980
- 158 RAMOS, E.H.; L.C.de BONGIOANNI; S.R.WAINER und A.O.M.STOPPANI: Amino acid uptake by yeasts. IV Effect of thiol reagents on L-leucine transport in Saccharomyces cerevisiae. Biochim.Biophys. Acta 731, 361-372, 1981
- 159 RAVEN, J.A.: Transport in algal cells. In: Encyclopedia of Plant Physiology New Series, Volume 2 - Transport in Plants II, Part A Cells. U.Lüttge und M.G.Pitman (Ed.) Springer Verlag Berlin, Heidelberg New York 1976, pp. 129-188
- 160 REINHOLD, L. und A.KAPLAN: Membrane transport of sugars and amino acids. Ann.Rev.Plant.Physiol. 35, 45-83, 1984
- 161 RETIG, J.N.: M.A.KIRCHBERGER; E.RUBIN und A.M.KATZ: Effects of ethanol on calcium transport by microsomes phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase. Biochem.Pharmacol. 26, 393-396, 1977
- 162 REUVENY, Z. und P.FILNER: Regulation of adenosine triphosphate sulfurylase in cultured tobacco cells. Effect of sulfur and nitrogen sources on the formation and decay of the enzyme. J.Biol.Chem. 252(6), 1858-1864, 1977
- 163 RIPIN, M.J.; K.F.NOON und T.M.COOK: Bacterial metabolism of arylsulfonates. 1. Benzene sulfonates as growth substrates for Pseudomonas testosteroni H-8. Appl.Microbiol. 21, 495-499, 1971
- 164 RIPIN, M.J.; T.M.COOK; K.F.NOON und L.E.STARK: Bacterial metabolism of arylsulfonates: Role of meta cleavage in benzene sulfonate oxidation by Pseudomonas testosteroni. Appl.Microbiol. 29, 382-387, 1975

- 165 RIPPKA, R.; J.DERUELLES; J.B.WATERBURY; M.HERDMANN und R.Y.STANIER:
Generic assignments, strain histories and properties of pure
cultures of Cyanobacteria. J.Gen.Microbiol.111, 1-61, 1979
- 166 RHOADS, D.E.; R.K.OCKNER; N.A.PETERON und E.RAGHUPATHY: Modulation of
membrane transport by free fatty acids: Inhibition of
synaptosomal sodium-dependent amino acid uptake.
Biochem. 22, 1695-1970, 1983
- 167 ROOMANS, G.J.; G.A.J.KUYPERS; A.P.R.THEUVENET und G.W.F.G.BORST-PAUWELS:
Kinetics of sulfate uptake by yeast.
Biochim.Biophys.Acta 551, 197-206, 1979
- 168 ROSENKRANZ, K.: Untersuchungen zur Regulation der APS-Sulfotransferase
aus der Grünalge Chlorella fusca. Diplomarbeit, München 1985
- 169 SCHLÖSSER, U.G.: Sammlung von Algenkulturen.
Ber.Detsch.Bot.Ges. 95, 181-276, 1982
- 170 SCHLÖSSER, U.G.: Sammlung von Algenkulturen Göttingen: Additions to the
collection since 1982.
Ber.Detsch.Bot.Ges. 97, 465-475, 1984
- 171 SCHMIDT, A.: Distribution of APS sulfotransferase activity among higher
plants. Plant Sci.Lett. 5, 407-415, 1975
- 172 SCHMIDT, A. und I.ERDLE: A cysteine desulphydrase specific for D-cysteine
from the green alga Chlorella fusca.
Z.Naturforsch. 38c, 428-435, 1983
- 173 SCHNEIDER, R.P. und W.R.WILEY: Regulation of sugar transport in Neurospora
crassa. J.Bact. 106, 487-492, 1971
- 174 SCHULZE, K.L.: Beiträge zur Physiologie und Technologie der Fettbildung
bei Mikroorganismen. Arch.Mikrobiol. 15, 315-351, 1950
- 175 SERRANO, R.: Plasma membrane ATPase of fungi and plants as a novel type
of proton pump. Curr.Top.Cell.Regul.23, 87-126, 1984
- 176 SHIBUYA, I.; T.YAGI und A.A.Benson: Sulfonic acids in algae. In: Studies
on microalgae & photosynthetic bacterial. Special issue of Plant
and Cell Physiology, Japanese Society of Plant Physiologists (Ed.).
The University of Tokyo Press 1963, pp.627-636

- 177 SHIMAMOTO, G. und R.S.BERK: Catabolism of taurine in Pseudomonas aeruginosa. Biochim.Biophys.Acta 569, 287-292, 1979
- 178 SHIMAMOTO, G. und R.S.BERK: Taurine catabolism. II Biochemical and genetic evidence for sulfoacetaldehyde sulfo-lyase involvement. Biochim.Biophys.Acta 632, 121-130, 1980
- 179 SHIMAMOTO, G. und R.S.BERK: Taurine catabolism. III Evidence for the participation of the glyoxylate cycle. Biochim.Biophys.Acta 632, 399-407, 1980
- 180 SIEGEL, L.M.: A direct microdetermination for sulfide. Anal.Biochem. 11, 125-132, 1965
- 181 SMILEY, D.W. und B.J.WILKINSON: Survey of taurine uptake and metabolism in Staphylococcus aureus. J.Gen.Microbiol.129, 2421-2428, 1983
- 182 SMITH, I.K.: Sulfate transport in cultured tobacco cells. Plant Physiol. 55, 303-307, 1975
- 183 SMITH, I.K.: Regulation of sulfate assimilation in tobacco cells. Effect of nitrogen and sulfur nutrition on sulfate permease and on O-Acetylserine sulphydrylase. Plant Physiol.66, 877-883, 1980
- 184 SPALDING, M.H.; R.SPRIETZER und W.L.OGREN: Genetic and physiological analysis of the CO₂-concentrating system of Chlamydomonas reinhardtii. Planta 159, 261-266, 1983
- 185 STANIER, R.Y.; R.KUNISAWA; M.MANDEL und G.COHEN-BAZIRE: Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales) Bacteriol.Rev. 35, 171-205, 1971
- 186 STAPLEY, E.O. und R.L.STARKEY: Decomposition of cysteic acid and taurine by soil micro-organisms. J.Gen.Microbiol.64, 77-84, 1970
- 187 STOCK, J. und S.ROSEMAN: A sodium-dependent sugar co-transport system in bacteria. Biochem.Biophys.Res.Commun.44, 132-138, 1971
- 188 STURMAN, J.A.; G.W.HEPNER; A.F.HOFMAN und P.J.THOMAS: Metabolism of ³⁵S-taurine in man. J.Nutr. 105, 1206-1214, 1975
- 189 SZULMAJSTER, J.: Is sporulation a simple model for studying differentiation? Trends Biochem.Sci. 1, 19-22, 1979

- 190 TAYLOR, C.D. und R.S.WOLFE: Structure and methylation of coenzyme M
(SH-CH₂-CH₂-SO₃). J.Biol.Chem. 249(15), 4879-4885, 1974
- 191 THURSTON, J.H.; R.E.HAUHART und E.F.NACCARATO: Taurine: Possible role
in osmotic regulation of mammalian heart.
Science 214, 1373-1374, 1981
- 192 THYSSE G.J.E. und T.H.WANDERS: Initial steps in the degradation of
n-alkane-1-sulfonates by Pseudomonas.
Antonie van Leeuwenhoek, J.Microbiol.Serol.40, 25-37, 1974
- 193 THOIRON, A.; B.THOIRON; M.DEMARTY und M.THELLIER: Compartmental analysis
of sulfate transport in Lemna minor L., taking plant growth
and sulfate metabolization into consideration.
Biochim.Biophys.Acta 644, 24-35, 1981
- 194 TISCHNER, R.: Zur Induktion der Nitrat-und Nitritreduktase in voll-
synchronen Chlorella-Kulturen. Planta 132, 285-290, 1976
- 195 TISCHNER, R. und H.LORENZEN: Nitrate uptake and nitrate reduction in
synchronous Chlorella. Planta 146, 287-292, 1979
- 196 TISCHNER, R. und A.HÜTTERMANN: Regulation of glutamine synthetase by light
and during nitrogen deficiency in synchronous Chlorella sorokiniana. Plant Physiol. 66, 805-808, 1980
- 197 TISCHNER, R. und H.LORENZEN: Nitrate uptake and reduction in Chlorella.
Characterization of nitrate uptake in nitrate-grown and nitrogen-
starved Chlorella sorokiniana. In: H.Bothe und A.Trebst (Hrsg)
Biology of inorganic nitrogen and sulfur. Springer Verlag Berlin
Heidelberg, New York 1981, pp.252-259
- 198 ULLMANN XVI. Ullmanns Enzyklopädie der technischen Chemie.
Urban und Schwarzenberg 1965
- 199 ULLRICH, W.R.; H.-D.SCHMITT und E.ARTZ: Regulation of nitrate uptake in
green algae and duckweed. Effect of starvation and induction.
In: H.Bothe und A.Trebst (Hrsg). Biology of inorganic nitrogen
and sulfur. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1981,
pp. 244-251
- 200 UTKILEN, H.C.; M.HELDAL und G.KNUTSEN: Characterization of sulfate uptake
in Anacystis nidulans. Plant Physiol.38, 217-220, 1976

- 201 VALLÉE, M. und R.JEANJEAN: Le système de transport de SO_4^{2-} chez Chlorella pyrenoidosa et sa régulation. I. Étude de la perméation. Biochim.Biophys.Acta 150, 599-606, 1968
- 202 VALLÉE, M. und R.JEANJEAN: Le système de transport de SO_4^{2-} chez Chlorella pyrenoidosa et sa régulation. II Recherches sur la régulation de l'entrée. Biochim.Biophys.Acta 150, 607-610, 1968
- 203 WAGNER, F.C. und E.E.RIED: The stability of the carbon-sulfur bond in some aliphatic sulfonic acids. J.Am.Chem.Soc. 53, 3407-3414, 1931
- 204 WATANBAE, N.; T.YOKOTA und N.TAKAHASHI: Transfer RNA, a possible supplier of free cytokinins, ribosyl-cis zeatin and ribosyl-2-methyl-thiozeatin: Quantitative comparison between free and transfer cytokinins in various tissues of the hop plant. Plant & Cell Physiol. 23, 479-488, 1982
- 205 WICKBERG, B.: Isolation of 2-L-amino-3-hydroxy-1-propane sulfonic acid from Polysiphonia fastigiata. Acta Chem.Scand.11, 506-511, 1957
- 206 WILEY, W.R. und W.H.MATCHETT: Tryptophan transport in Neurospora crassa. II Metabolic control, J.Bact. 96, 959-966, 1968
- 207 WILLETTS, A.J. und R.B.CAIN: Microbial metabolism of alkylbenzene sulfonates. Bacterial metabolism of undecylbenzene-p-sulfonate and dodecyl-benzene-p-sulfonate. Biochem.J. 129, 389-402, 1972
- 208 WILLETTS, A.J.: Microbial metabolism of alkylbenzene sulfonates. Fungal metabolism of 1-phenylundecane-p-sulfonate and 1-phenyl-dodecane-p-sulfonate. Antonie van Leeuwenhoek, J.Microbiol.Serol. 39, 585-597, 1973
- 209 WILLIAMS II, S.K. und R.C.HODSON: Transport of urea at low concentrations in Chlamydomonas reinhardtii. J.Bact. 130, 266-273, 1977
- 210 YAMAMOTO, L.A. und I.H.SEGEL: The inorganic sulfate transport system of Penicillium chrysogenum. Arch.Biochem.Biophys. 114, 523-538, 1966
- 211 YOUNG, J.D.: Effects of thiol-reactive agents on amino acid transport by sheep erythrocytes. Biochim.Biophys.Acta 602, 661-672, 1980
- 212 ZDROU, I. und H.W.TROMBALLA: Active transport of chloride in Anacystis nidulans. Arch.Mikrobiol. 129, 325-330, 1981

- 213 ZINK, M.W.: Regulation of ATP-sulfurylase by various nitrogen and sulfur sources in cultured Ipomoea sp.
Can.J.Bot. 62, 2017-2113, 1984

Die vorliegende Arbeit wurde am Botanischen Institut der Universität München unter Leitung von Prof.Dr.A.Schmidt von 1982 bis 1986 angefertigt.

Herrn Prof.Dr.A.Schmidt danke ich für die Themenstellung, die vielfältigen Ratschläge und die anregenden Diskussionen.

Bei Frau.I.Erdle und Herrn F.K.Krauss bedanke ich mich für die Einführung in die Laborpraxis.

Herrn Dr.habil. H.-P.Köst danke ich für die Synthese der ³⁵S-markierten Äthansulfonsäure und anderer Verbindungen.

Herrn G.Henkelmann danke ich für das Interesse an meiner Arbeit und die Durchführung der Fettsäureanalysen.

Frau v.Bülow sei für die ständige Hilfsbereitschaft und freundliche Zuwendung bedankt.

Außerdem danke ich Dr.G.Wanner für die Untersuchungen am Elektronenmikroskop, Prof.Dr.F.Fiedler und Priv-Doz. Dr.R.Hensel für die Durchführung der Aminosäureanalysen, sowie Prof.Dr.Elstner für die Analyse von Äthan/Äthen.

Mein Dank gilt auch allen kollegialen Mitarbeitern des Botanischen Institutes.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die gewährte finanzielle Unterstützung.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern und Herrn v.Matzenau für die geduldige Anteilnahme an dieser Arbeit.

Lebenslauf

- 1955 Geboren in Bietigheim am 7.August
- 1962 - 1966 Volksschule in Bietigheim
- 1966 - 1974 Mathematisch-Naturwissenschaftliches
Gymnasium in Bietigheim-Bissingen
- 1974-1980 Studium an der Universität Hohenheim
(Biologie und Chemie für das höhere Lehramt)
- 1976 Zwischenprüfung
- 1978 1.Staatsprüfung im Fach Chemie
- 1979 1.Staatsprüfung im Fach Biologie
- 1979-1980 Staatsexamensarbeit bei Prof.Dr.D.Heß,
Institut für Pflanzenphysiologie, Hohenheim
"Untersuchungen zur Charakterisierung der
UDP-Galactose-4-Epimerase (EC 5.1.3.2) aus
Petunia hybrida"
- 1980 - 1981 Besuch des Seminars Stuttgart-I
- 1981 2.Staatsexamen
- 1982 Beginn der Dissertationsarbeit bei
Prof.Dr.A.Schmidt am Botanischen
Institut der Universität München

